

**DESARROLLO DE UNA LÍNEA DE *Ricinus communis*
(Malpighiales: Euphorbiaceae) EDITADA
GENÉTICAMENTE CON LA TECNOLOGÍA
CRISPR/Cas9 PARA MAYOR PRODUCCIÓN DE ÁCIDO
RICINOLEICO-FASE I**

PAULA ANDREA FIGUEROA VARELA

Trabajo de investigación para optar el título de Magister en Ingeniería



Universidad EAFIT
Escuela de Ingeniería
Medellín, Colombia

2020

**DESARROLLO DE UNA LÍNEA DE *Ricinus communis*
(Malpighiales: Euphorbiaceae) EDITADA
GENÉTICAMENTE CON LA TECNOLOGÍA
CRISPR/Cas9 PARA MAYOR PRODUCCIÓN DE ÁCIDO
RICINOLEICO-FASE I**

PAULA ANDREA FIGUEROA VARELA

Trabajo de investigación para optar el título de Magister en Ingeniería

Director del trabajo de investigación

Diego Fernando Villanueva Mejía, Biólogo, MSc. PhD

Codirectora del trabajo de investigación

Martha Catalina Restrepo Osorio, Bióloga, MSc.

Universidad EAFIT

Escuela de Ingeniería

Medellín, Colombia

2020

Agradecimientos

Quiero agradecer principalmente a Dios por permitirme estar trabajando este proyecto de investigación y cada día crecer más en conocimientos. De igual manera a mi familia que siempre fueron un apoyo incondicional durante todo este proceso.

Un agradecimiento muy especial a mi comité de asesores, al Dr Diego Fernando Villanueva que deposito su confianza en mí para el desarrollo de proyecto, por su apoyo incondicional y sus lecciones de disciplina y orden, a la MSc Catalina Restrepo, que me compartió todos sus valiosos conocimientos y fue fundamental para la ejecución de la investigación. Así mismo, agradezco a cada una de las personas de los laboratorios que siempre me colaboraron de manera amable. Finalmente, y no menos importante a la universidad EAFIT, por sus instalaciones y financiamiento del proyecto, por la colaboración y siempre buena disposición en cada uno de los procesos que el proyecto demandó.

Tabla de contenido

CAPÍTULO I. CULTIVO IN VITRO DE <i>RICINUS COMMUNIS</i>	17
1.1. INTRODUCCIÓN	18
1.2. OBJETIVOS	19
1.2.1. OBJETIVO GENERAL	19
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
1.3. MARCO TEÓRICO	19
1.3.1. CULTIVO IN VITRO DE PLÁNTULAS DE <i>RICINUS COMMUNIS</i>	19
1.3.2. CULTIVO DE CALLOS	20
1.3.3. REGENERACIÓN <i>IN VITRO</i>	21
1.3.4. AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS	22
1.4. MATERIALES Y MÉTODOS.	23
1.4.1. MATERIAL VEGETAL.	24
1.4.1.1. Composición de los medios de cultivo y condiciones de crecimiento de callos de <i>R. communis</i> .	24
1.4.2. DESINFECCIÓN Y ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE PLÁNTULAS DE HIGUERILLA A PARTIR DE SEMILLAS	25
1.4.3. INDUCCIÓN DE CALLOS DE <i>R. COMMUNIS</i>	28
1.4.3.1. Inducción y multiplicación de callos	28
1.4.4. INDUCCIÓN DE BROTES A PARTIR DE CALLOS DE <i>R. COMMUNIS</i>	28
1.4.5. AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS	30
1.4.5.1. Cultivo de protoplastos	32
1.4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS MATRICES PARA ORGANOGÉNESIS CALLOS DE HIGUERILLA Y PARA OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS.	33
1.4.7. ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>RICINUS COMMUNIS</i> PARA OBTENCIÓN DE EPICÓTILOS Y LA SUBSECUENTE REGENERACIÓN DE PLÁNTULAS.	33
1.4.7.1. Inducción de brotes a partir de epicótilos.	34
1.5. RESULTADOS	34
1.5.1. INDUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE CALLOS.	34
1.5.1.1. Inducción de brotes a partir de callos nodulares	36
1.5.2. AISLAMIENTO PROTOPLASTOS DE <i>R. COMMUNIS</i>	40
1.5.2.1. Cultivo de protoplastos de <i>R. communis</i>	46
1.5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS MATRICES PARA ORGANOGÉNESIS CALLOS DE HIGUERILLA Y PARA OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS.	47

1.5.3.1. Análisis estadístico matrices organogénesis callos <i>R. communis</i>	47
1.5.3.2. Análisis estadístico para obtención de protoplastos	54
1.6. DISCUSIÓN	54
1.6.1. EFECTO DE DIFERENTES COMBINACIONES HORMONALES SOBRE LA INDUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE CALLO A PARTIR DE MESÓFILO DE <i>R. COMMUNIS</i> .	54
1.6.2. INDUCCIÓN DE BROTES A PARTIR DE CALLOS DE <i>R. COMMUNIS</i> .	55
1.6.3. AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS	56
1.6.3.1. Cultivo de protoplastos	58
1.7. CONCLUSIONES	59
1.8. REFERENCIAS	60

CAPÍTULO II. HACIA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE *RICINUS COMMUNIS*: ENTENDIENDO EL METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (PUFAS)

79

2.1. INTRODUCCIÓN	80
2.2. OBJETIVOS	80
2.2.1. OBJETIVO GENERAL	80
2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	80
2.3. MARCO TEÓRICO	81
2.3.1. HIGUERILLA (<i>RICINUS COMMUNIS</i>)	81
2.3.2. BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICEROLES EN <i>RICINUS COMMUNIS</i>	82
2.3.3. ENZIMAS DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS	87
2.3.4. BIOSÍNTESIS DE LINOLEATO COMO PRECURSOR PARA OTRAS RUTAS BIOSINTÉTICAS EN PLANTAS	88
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS	90
2.4.1. ANÁLISIS DE RUTAS METABÓLICAS	90
2.4.2. BÚSQUEDA DE SECUENCIAS CANDIDATAS DEL GEN FAD2 PARA EL DISEÑO DE SGRNA	90
2.4.3. DESARROLLO DE SGRNA Y VECTOR DE EXPRESIÓN	91
2.5. RESULTADOS	91
2.5.1. ANÁLISIS DE RUTAS METABÓLICAS.	91
2.5.2. DESARROLLO BIOINFORMÁTICO DE VECTORES Y SGRNA.	92
2.6. DISCUSIÓN	96
2.7. CONCLUSIONES	98
2.8. REFERENCIAS	99

CAPÍTULO III. MEJORAMIENTO GENÉTICO DE LA ESPECIE *RICINUS COMMUNIS* MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOTECNOLOGÍA MODERNA CON LA TECNOLOGÍA CRISPR/CAS9

119

3.1. INTRODUCCIÓN	120
3.2. OBJETIVOS	121
3.2.1. OBJETIVO GENERAL	121
3.2.2. Objetivos específicos	121
3.3. MARCO TEÓRICO	121
3.3.1. AGROBACTERIUM TUMEFACIENS	121
3.3.1.1. Transferencia del T-DNA	122
3.3.1.2. Integración del T-DNA	123
3.3.1.3. Genes de virulencia de <i>A. tumefaciens</i> en respuesta a señales de la planta	124
3.3.1.4. Transferencia genética Horizontal por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	125
3.3.1.5. Uso de <i>Agrobacterium</i> como herramienta biotecnológica en cultivos	125
3.3.1.6. Uso de <i>Agrobacterium</i> como sistema de edición genética tipo CRISPR/Cas9 en cultivos	127
3.3.2. SISTEMA CRISPR	128
3.3.2.1. Generación de los pequeños RNAs	128
3.3.2.2. Endonucleasas Cas	129
3.3.2.3. Mecanismo de acción del sistema CRISPR Cas en procariotas	130
3.3.2.4. Uso del sistema CRISPR/Cas9 en la biotecnología vegetal	132
3.3.2.5. Uso del sistema CRISPR como herramienta biotecnológica en cultivos	134
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS	137
3.4.1. TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR AGROBACTERIUM TUMEFACIENS EN EPICÓTILOS DE <i>RICINUS COMMUNIS</i> PARA LA EDICIÓN GENÉTICA DEL GEN FAD2.	137
3.4.1.1. Transformación <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con el vector CRISPR PL	138
3.4.1.2. Protocolo Transformación de plantas de <i>R. communis</i> con <i>Agrobacterium</i>	139
3.4.1.3. Identificación Molecular de las plantas transformadas de <i>R. communis</i>	139
3.4.1.3.1. Extracción de RNA de epicótilos de <i>R. communis</i>	140
3.4.1.3.2. Preparación cDNA a partir de muestras de RNA de epicótilos de <i>R. communis</i>	140
3.4.1.3.3. Amplificación del gen FAD2 en qPCR Real Time	141
3.4.1.3.4. Análisis de datos qPCR Real Time de la amplificación del gen FAD2 de epicótilos de <i>R. communis</i>	141
3.4.1.3.5. Extracción DNA de epicótilos de <i>R. communis</i> para Secuenciación	142
3.4.1.3.6. Amplificación del gen FAD2 en plantas de <i>R. communis</i> transformadas con <i>Agrobacterium</i>	142
3.4.2. TRANSFECCIÓN PROTOPLASTOS DE LA RIBONUCLEOPROTEÍNA CRISPR/CAS9 MEDIANTE PEG-4000	143
3.4.2.1. Ensayo verificación protocolo de transfección mediante PEG-4000	143
3.4.2.2. Transfección de protoplastos de <i>R. communis</i> con la ribonucleoproteína CRISPR/Cas9 mediante PEG 4000	146
3.5. RESULTADOS	148

3.5.1. TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> EN EPICÓTILOS DE <i>RICINUS COMMUNIS</i> PARA LA EDICIÓN GENÉTICA DEL GEN FAD2.	148
3.5.1.1 Transformación cepa <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	148
3.5.1.2 Transformación plantas	149
3.5.1.3. Análisis mediante qPCR de las plantas de <i>R. communis</i> sometidas a la transformación mediada <i>Agrobacterium</i> .	151
3.5.2. TRANSFECCIÓN DE PROTOPLASTOS DE <i>RICINUS COMMUNIS</i> MEDIANTE LA RIBONUCLEOPROTEÍNA CRISPR/Cas9	157
3.5.2.1. Amplificación del gen de resistencia del plásmido control ingresado a protoplastos de <i>Ricinus communis</i> .	157
3.5.2.2. Transfección de protoplastos de <i>Ricinus communis</i> mediante la ribonucleoproteína CRISPR/Cas9.	158
3.5.2.2.1. Secuenciación de los productos de PCR del gen FAD2 de las muestras de <i>R. communis</i> transformados con <i>Agrobacterium</i> y protoplastos de <i>R. communis</i> transfectados con RNP.	158
3.6. DISCUSIÓN	159
3.7. CONCLUSIONES	161
3.8. REFERENCIAS	162
<u>4.RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS FINALES.</u>	<u>181</u>

Lista de Figuras

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA EN EL CAPÍTULO No 1, PARA ESTABLECIMIENTO Y REGENERACIÓN DE PLANTAS DE <i>R. COMMUNIS</i> . LOS RECUADROS AMARILLOS INDICAN LA SECCIÓN ESPECÍFICA EN “MATERIALES Y MÉTODOS” DONDE SE DESCRIBEN MAYORES DETALLES.....	25
FIGURA 2: METODOLOGÍA PARA OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS DE <i>RICINUS COMMUNIS</i>	27
FIGURA 3. A. HOJAS JÓVENES DE PLANTAS <i>IN VITRO</i> DE <i>R. COMMUNIS</i> SEMBRADAS POR EL ENVÉS. B. ENCORVAMIENTO DE LA HOJA CON FORMACIÓN DE PEQUEÑOS PUNTOS DE CALLOS EN TRATAMIENTO 2. C. PROLIFERACIÓN DE CALLO EN EL TRATAMIENTO 1. D. NECROSIS DE LAS HOJAS EN EL TRATAMIENTO 8. E. PROLIFERACIÓN DE CALLO EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN DE CALLOS. F. FENOLIZACIÓN DE ALGUNOS CALLOS EN ETAPA DE MULTIPLICACIÓN.....	36
FIGURA 4. FORMACIÓN DE CALLOS COMPACTOS DE LA MATRIZ 1. A CALLO EMBRIOGÉNICO FRIABLE. B Y C CALLOS DISGREGADOS. D CALLO DURO COMPACTO.....	38
FIGURA 5. A, B Y C CALLOS DUROS Y COMPACTOS OBTENIDOS EN LA MATRIZ 4 PARA LA FORMACIÓN DE BROTES.....	40
FIGURA 6. METODOLOGÍA PARA OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE MESÓFILO DE PLANTAS DE <i>RICINUS COMMUNIS</i> HACIENDO USO DE LAS ENZIMAS CELULASA R-10 Y MACEROZYMA R-10.	41
FIGURA 7. A. VISUALIZACIÓN DE CÉLULAS DE CALLOS DE <i>R. COMMUNIS</i> AISLADAS MEDIANTE DIGESTIÓN ENZIMÁTICA. 40X. B. CÉLULAS DE MESÓFILO DE <i>R. COMMUNIS</i> DE LOS TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS 1, 2 Y 3. 40X.....	44
FIGURA 8. A Y B. CÉLULAS DE MESÓFILO DE <i>R. COMMUNIS</i> OBTENIDAS DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO 4 (1.6% DE CELULASA Y 0.8% DE MACEROZYMA, CON 16 HORAS DE INCUBACIÓN A 29°C, VER TABLA 1) OBJETIVO 40X	45

FIGURA 9. GRÁFICA DE OBTENCIÓN Y VIABILIDAD DE LOS PROTOPLASTOS OBTENIDOS A PARTIR DE MESÓFILO DE <i>R. COMMUNIS</i>	46
FIGURA 10. A Y B. PEQUEÑAS COLONIAS DE MICROCALLOS DE <i>RICINUS COMMUNIS</i> FORMADOS A PARTIR DE PROTOPLASTOS DE MESÓFILO.	47
FIGURA 11. GRÁFICA DE DIAGRAMA DE FRECUENCIA PARA LA COLORACIÓN DE LA MATRIZ 1.	48
FIGURA 12. GRÁFICA DE DIAGRAMA DE FRECUENCIA PARA LA TEXTURA DE LA MATRIZ 1.	48
FIGURA 13. GRÁFICA PARA LA MEDIA DEL PESO EN GRAMOS PARA CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS DE LA MATRIZ 1. (PRESENTADOS EN LA TABLA 8).	49
FIGURA 14. GRÁFICA PARA LA MEDIA DEL CRECIMIENTO EN CENTÍMETROS DE LOS CALLOS EN CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS DE LA MATRIZ 1 (PRESENTADOS EN LA TABLA 8)	50
FIGURA 15. GRÁFICA DE DIAGRAMA DE FRECUENCIA PARA LA TEXTURA DE LA MATRIZ 2.	51
FIGURA 16. GRÁFICA DE DIAGRAMA DE FRECUENCIA PARA LA TEXTURA DE LA MATRIZ 2.	51
FIGURA 17. GRÁFICA DE DIAGRAMA DE FRECUENCIA PARA LA TEXTURA DE LA MATRIZ 3.	52
FIGURA 18. GRÁFICA DE DIAGRAMA DE FRECUENCIA PARA LA TEXTURA DE LA MATRIZ 3.	52
FIGURA 19. GRÁFICA DE DIAGRAMA DE FRECUENCIA PARA LA TEXTURA DE LA MATRIZ 4.	53
FIGURA 20. GRÁFICA DE DIAGRAMA DE FRECUENCIA PARA LA TEXTURA DE LA MATRIZ 4.	53
FIGURA 21. GRÁFICA DE MEDIA DE PRODUCCIÓN DE PROTOPLASTOS OBTENIDOS A PARTIR DE MESÓFILO DE <i>R. COMMUNIS</i>	54
FIGURA 22. ESQUEMA PRESENTADO POR McKEON, CHEN, AND LIN 2000 PARA LA BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO RICINOLEICO EN <i>RICINUS COMMUNIS</i>	84

FIGURA 23. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES QUE CODIFICAN LAS ENZIMAS CLAVE PARA LA BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO RICINOLEICO EN <i>RICINUS COMMUNIS</i> . TOMADA DE WANG ET AL. 2019.	86
FIGURA 24. ESQUEMA ELABORADO CON EL SOFTWARE METACYC (CASPI ET AL. 2014) PARA LA BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO LINOLEICO EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>).	89
FIGURA 25. VISUALIZACIÓN DE RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA DE SGRNA PARA EL GEN FAD2 DE <i>RICINUS COMMUNIS</i> EN LA PLATAFORMA CRISPRDIRECT	92
FIGURA 26. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA BÚSQUEDA DE OFF-TARGETS SUMINISTRADA POR LA PLATAFORMA CRISPRDIRECT	93
FIGURA 27. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL VECTOR DE EXPRESIÓN CRISPRPL QUE SE UTILIZARÁ EN LA TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM</i> EN EXPLANTES DE <i>R. COMMUNIS</i> (VER CAPÍTULO 3).....	94
FIGURA 28. KIT CRISPREVOLUTION DE LA COMPAÑÍA SYNTHIGO. DE IZQUIERDA A DERECHA, SGRNA PARA LA SECUENCIA CRISPR 27, SGRNA PARA LA SECUENCIA CRISPR 79, VIAL CON 15 µL DE LA NUCLEASA CAS9, AGUA LIBRE DE NUCLEASAS Y 1X BUFFER TE.....	94
FIGURA 29. REPRESENTACIÓN DE LOS DOS SITIOS DE EDICIÓN CON SU RESPECTIVA SECUENCIA PARA EL GEN FAD2 DE <i>RICINUS COMMUNIS</i>	95
FIGURA 30. UBICACIÓN DE LOS DOS SGRNA EN LA SECUENCIA DEL GEN FAD DE <i>RICINUS COMMUNIS</i>	95
FIGURA 31. KIT DE SIGMA-ALDRICH QUE CONTIENE LOS DOS VIALES DE LOS PLÁSMIDOS. CADA UNO CON LA SECUENCIA PARTICULAR DE SGRNA.....	96
FIGURA 32. ILUSTRACIÓN QUE DESCRIBE LA TRANSFERENCIA DE DNA POR PARTE DE <i>AGROBACTERIUM</i> A LA CELULA DE LA PLANTA. TOMADO DE (SINGER 2013).....	123
FIGURA 33. REPRESENTACIÓN DE LOS TIPOS DE PROTEÍNA CAS, DESDE LAS MÁS UNIVERSALES HASTA LAS MÁS ESPECÍFICAS ENCONTRADAS. TOMADA DE TERNS AND TERNS 2015.	130

FIGURA 34. ESQUEMA QUE REPRESENTA EL MECANISMO DE ACCIÓN DEL SISTEMA CRISPR/CAS EN PROCARIOTAS. TOMADO DE (TERNS AND TERNS 2014).....	132
FIGURA 35. PANORAMA MUNDIAL DE LAS REGULACIONES DE CULTIVOS BASADOS EN EDICIÓN GENÉTICA. TOMADO DE METJE-SPRINK, SPRINK, AND HARTUNG 2020	134
FIGURA 36. A Y B, CÉLULAS DE LA CEPA LBA4404 DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO CRISPRPL. C. CONTROL NEGATIVO, CEPAS WILD TYPE DE LBA4404 EN MEDIO SUPLEMENTADO CON KANAMICINA 50 MG/ML	148
FIGURA 37. ELECTROFORESIS AL 1.2% EN GEL DE AGAROSA EN EL QUE SE EVIDENCIAN LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DEL GEN DE RESISTENCIA DE HIGROMICINA QUE CONTIENE EL PLÁSMIDO CRISPRPL. CARRIL 1, AMPLIFICACIÓN GEN EN CEPA LBA4404 NO TRANSFORMADAS. CARRILES 2, 3, 4 Y 5 AMPLIFICACIÓN EN LBA4404 TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO CRISPRPL	149
FIGURA 38. ESQUEMA DE TRANSFORMACIÓN MEDIANTE <i>A. TUMEFACIENS</i> QUE CONTIENE EL VECTOR CRISPR EN EPICÓTILOS DE <i>R. COMMUNIS</i>	150
FIGURA 39. EPICÓTILOS DE <i>R. COMMUNIS</i> REGENERADOS EN MEDIO DE SELECCIÓN DESPUÉS DE PROCESO DE INFECCIÓN CON <i>AGROBACTERIUM</i> CON PLÁSMIDO CRISPRPL	151
FIGURA 40. GRÁFICA DE CUANTIFICACIÓN RELATIVA PARA LAS PLANTAS DE <i>R. COMMUNIS</i> DE LA TABLA 25 PARA EL GEN FAD2.	153
FIGURA 41. CURVA DE AMPLIFICACIÓN DE QRT-PCR PARA EL GEN FAD2 DE LAS MUESTRAS DE CDNA DE LAS PLANTAS SOMETIDAS AL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN MEDIADA CON <i>AGROBACTERIUM</i> CON EL PLÁSMIDO CRISPR. EN VERDE, PLANTAS SOMETIDAS AL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN, EN ROJO PLANTAS WILD TYPE.	154
FIGURA 42. CURVAS DE MELTING DE QRT-PCR PARA EL GEN FAD2 DE LAS MUESTRAS DE CDNA DE LAS PLANTAS SOMETIDAS AL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN MEDIADA CON <i>AGROBACTERIUM</i> CON EL PLÁSMIDO CRISPR. EN VERDE, PLANTAS SOMETIDAS AL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN, EN ROJO PLANTAS WILD TYPE.	155
FIGURA 43. HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS PARA LAS MUESTRAS DE CDNA DE LAS PLANTAS DE INTERÉS. A. CLUSTER ROJO SON LAS PLANTAS WILD TYPE, CLUSTER AZUL, VERDE Y NARANJA SON PLANTAS SOMETIDAS AL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN. B Y C, CLUSTER AZUL SON PLANTAS WILD TYPE Y CLUSTER ROJO, VERDE Y NARANJA PLANTAS SOMETIDAS AL	

PROCESO DE TRANSFORMACIÓN. LA FLUORESCENCIA SE EXPRESA EN UNIDADES DE FLUORESCENCIA RELATIVA (RFU).....	156
FIGURA 44. A Y B. ELECTROFORESIS AL 1.2% DE AGAROSA MUESTRA LOS RESULTADOS DE LAS AMPLIFICACIONES DEL GEN <i>HPTII</i> DEL PLÁSMIDO pCAMBIA 1305.2 QUE SE INGRESÓ A PROTOPLASTOS DE <i>R. COMMUNIS</i> MEDIANTE TRANSFECCIÓN MEDIADA POR PEG-4000 CÓMO PRUEBA PILOTO.....	158

Lista de Tablas

TABLA 1. CONCENTRACIONES DE HORMONAS UTILIZADAS PARA INDUCCIÓN DE CALLO.....	28
TABLA 2. MATRIZ #1: CONCENTRACIÓN DE FITOHORMONAS EVALUADAS PARA LA INDUCCIÓN DE CALLO NODULAR EN <i>RICINUS COMMUNIS</i>	29
TABLA 3. CONCENTRACIONES DE FITOHORMONAS EN DIVERSAS MATRICES UTILIZADAS PARA FORMACIÓN DE BROTES EN <i>RICINUS COMMUNIS</i>	30
TABLA 4. MEZCLA ENZIMÁTICA Y TIEMPOS DE INCUBACIÓN EVALUADOS PARA EL AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE MESÓFILO EN <i>R. COMMUNIS</i>	32
TABLA 5. PORCENTAJE DE INDUCCIÓN DE CALLO FORMADO A PARTIR DE HOJAS EN DIFERENTES TRATAMIENTOS HORMONALES.....	35
TABLA 6. DIFERENCIA DE PESO (G) Y TIPO DE CALLO EN CADA UNO DE LOS 3 TRATAMIENTOS EVALUADOS EN <i>R. COMMUNIS</i>	35
TABLA 7. RESPUESTA DE LOS CALLOS DE <i>R. COMMUNIS</i> A DIFERENTES TRATAMIENTOS HORMONALES PARA LA REGENERACIÓN.	37
TABLA 8. RESPUESTA DE LOS CALLOS A DIFERENTES TRATAMIENTOS HORMONALES PARA LA FORMACIÓN DE BROTES.....	39
TABLA 9. MEZCLA ENZIMÁTICA DE FITOHORMONAS Y TIEMPOS DE INCUBACIÓN EVALUADAS PARA EL AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE MESÓFILO.	43

TABLA 10. SUBTIPO DE LOS GENES CAS Y EL ORGANISMO DÓNDE SE ENCUENTRA (TERNS AND TERNS 2014).....	129
TABLA 11. CULTIVOS DE PLANTAS EDITADAS GENÉTICAMENTE QUE SE HAN EVALUADO EN CAMPO. TOMADA DE METJE-SPRINK, SPRINK, AND HARTUNG 2020	135
TABLA 12. EJEMPLOS DE CULTIVOS TROPICALES QUE HAN SIDO EDITADOS GENÉTICAMENTE MEDIANTE CRISPR, PARA DESARROLLO DE TOLERANCIA A ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO. TOMADA DE HAQUE ET AL. 2018.	136
TABLA 13. GENES DE PLANTAS TROPICALES QUE HAN SIDO EDITADOS GENÉTICAMENTE MEDIANTE CRISPR, PARA DESARROLLO DE TOLERANCIA A ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO. TOMADA DE HAQUE ET AL. 2018.	136
TABLA 14. PCR DE COLONIAS DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> PARA AMPLIFICACIÓN DE GEN DE RESISTENCIA A HIGROMICINA (HPTII).....	138
TABLA 15. LISTA DE PRIMERS EMPLEADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS TRANSFORMACIONES EN <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> Y <i>RICINUS COMMUNIS</i>	140
TABLA 16. PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE CDNA A PARTIR DEL RNA EXTRAÍDO DE LOS EPICÓTILOS DE <i>R. COMMUNIS</i> SOMETIDOS A TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM</i>	141
TABLA 17. CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTO DEL GEN FAD2 CON PRIMER 106 EN PLANTAS TRANSFORMADAS.....	142
TABLA 18. SOLUCIÓN DE LAVADO DE PROTOPLASTOS W5	144
TABLA 19. SOLUCIÓN DE TRANSFECCIÓN QUE CONTIENE POLIETILENGLICOL 4000	144
TABLA 20. SOLUCIÓN MMG PARA RESUSPENDER LOS PROTOPLASTOS.....	145
TABLA 21. REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE PROTOPLASTOS DE <i>R. COMMUNIS</i>	145

TABLA 22. CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA A HIGROMICINA (<i>HTP^{II}</i>) EN PROTOPLASTOS DE <i>R. COMMUNIS</i> TRANSFORMADOS CON PLÁSMIDO pCAMBIA 1305.2.....	145
TABLA 23. SE HICIERON EXPERIMENTOS DE TRANSFECCIÓN DE RNP A LOS PROTOPLASTOS CON LAS SIGUIENTES CONCENTRACIONES DE SGRNA Y CAS9.....	146
TABLA 24. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTO 106 QUE INCLUYE LAS DOS ZONAS DE EDICIÓN CON LA RNP EN EL GEN FAD2 EN PROTOPLASTOS DE <i>R. COMMUNIS</i>	147
TABLA 25. PLANTAS QUE FUERON SOMETIDAS AL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN QUE LOGRARON LLEGAR A FASE DE REGENERACIÓN. SE MUESTRA LA CUANTIFICACIÓN RELATIVA NORMALIZADA A PLANTAS WILD TYPE DE <i>R. COMMUNIS</i> PARA EL GEN FAD2 CON CADA UNO DE LOS SGRNA.....	152
TABLA 26. MUESTRAS QUE CORRESPONDEN A CADA UNO DE LOS CLÚSTERES DEL ANÁLISIS HRM QUE SE VISUALIZAN EN LA FIGURA 40.	157

Capítulo I. Cultivo *in vitro* de *Ricinus communis*

1.1.Introducción

Ricinus communis o Higuierilla, es una planta que pertenece a la familia Euphorbiaceae, y que tiene su centro de origen en Ethiopia. Es una importante planta oleaginosa no comestible, cultivada extensamente en el mundo, especialmente en regiones tropicales, subtropicales y templadas debido al alto contenido en aceite de ricino de sus semillas y por lo tanto, sus amplias aplicaciones en la industria y la agricultura (Rampadarath and Puchooa 2016). La principal razón para considerar el cultivo de *R. communis* como no comestible, se debe a que sus semillas son venenosas para los seres humanos y los animales, debido a que contienen una proteína ricina tóxica, la cual está ausente del propio aceite (Ogunniyi 2006). A nivel mundial, entre las diferentes variedades de *R. communis* disponibles, se ha estimado que el 46-55% del peso de las semillas, es aceite (Ogunniyi 2006). De ese porcentaje de aceite, el 89.15% es ácido ricinoleico (Berman, Nizri, and Wiesman 2011a). Otros ácidos grasos allí presentes son: 4.2% ácido linoleico, 3% ácido oleico, 1% ácido esteárico, 1% ácido palmítico, 0.7% ácido dihidroxiestearico, y 0.3% ácido eicosanoico. Con el foco puesto en el alto nivel de producción natural de aceite *R. communis* (1.791.409 toneladas de producción a nivel mundial para el 2017) (FAO, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>) y por ende, del ácido ricinoleico, la industria ha catalogado a esta planta de gran interés (Ogunniyi 2006), Según la FAO (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>) a nivel mundial, el mayor productor de semillas de *R. communis* es Asia con un 89.1%, seguido por América (5.9%), África (4.9%) y Europa (0.1%). El aceite de ricino es respetuoso con el medio ambiente y en relación con otros aceites vegetales, tiene una buena vida útil. La producción intensiva y la comercialización de aceites de origen vegetal que proviene de cultivos comestibles ha generado preocupaciones ambientales críticas. Para mitigar estas consecuencias ambientales, se están incrementando las investigaciones en semillas oleaginosas para la producción de aceite como materia prima en la industria (Berman, Nizri, and Wiesman 2011a). Sin embargo, el cultivo extensivo de plantas oleaginosas compite por la disponibilidad de tierra con respecto a los cultivos de alimentos, por lo tanto, la producción de aceite de ricino a nivel mundial ha ganado interés, al punto tal que se necesitan herramientas que vayan más allá de cultivar más hectáreas, sino que se necesitan establecer otras metodologías para el incremento de este aceite.

Para contribuir a este último aspecto, la biotecnología moderna nos ofrece metodologías y técnicas hacia el mejoramiento genético o para potencializar características deseables en la planta. No obstante, para alcanzar una producción efectiva de plántulas mejoradas genéticamente, es necesario desarrollar y perfeccionar protocolos para la regeneración de plantas a nivel *in vitro*. Establecer un medio de cultivo *in vitro* óptimo para la regeneración de plántulas de *R. communis* a partir de explantes, facilita el camino para emprender programas de mejoramiento genético, sin embargo, la falta de un protocolo común de regeneración *in vitro* para todas las variedades de higuierilla, hace necesario continuar con investigaciones, con miras a lograr procesos de organogénesis sobre todo en aquellas variedades donde no se ha encontrado las condiciones

óptimas de cultivo, tales como medio de cultivo basal y reguladores de crecimiento, y así proporcionar un conocimiento más amplio que lleve a definir cuáles son los factores determinantes en la regeneración *in vitro*. En consecuencia, el capítulo No 1 de este trabajo de grado de maestría, se centró en generar las condiciones ideales para la desinfección, establecimiento, regeneración y multiplicación de plantas de *R. communis* bajo condiciones de laboratorio.

1.2.Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Establecer una metodología de regeneración vía organogénesis y obtención de protoplastos de *Ricinus communis*

1.2.2. Objetivos específicos

- a. Evaluar diferentes reguladores de crecimiento para la inducción y multiplicación de callos a partir de hojas.
- b. Evaluar el efecto de la concentración enzimática y el tiempo de incubación en la obtención de protoplastos de higuera con alto porcentaje de viabilidad a partir de mesófilo y callos.
- c. Determinar la concentración hormonal para la regeneración de plantas vía organogénesis a partir de callos.

1.3. Marco Teórico

1.3.1. Cultivo *in vitro* de plántulas de *Ricinus communis*

Estudios en regeneración *in vitro* de plantas y transformación genética ha permitido la producción y comercialización de plantas transgénicas (ISAAA, 2019). Para realizar investigaciones en ingeniería genética en plantas, se requiere un sistema eficiente de regeneración *in vitro* de las plantas de interés (Birch 1997), sistema que debe contar con características como ser rápido, confiable y aplicable a un amplio rango de genotipos (Sujatha, Reddy, and Mahasi 2008a). No obstante, técnicas en cultivo de tejidos en higuera y otras euforbiáceas (a excepción de *Cassava* y *Hevea brasiliensis*), están menos avanzadas. (Sujatha, Reddy, and Mahasi 2008a).

Los primeros estudios vinculados al cultivo de tejidos en higuera fueron principalmente con cultivos de endospermo a partir de semillas (Thomas and Chaturvedi 2008), pero el cultivo de tejidos a partir de semillas no permite el estudio detallado de las capacidades del endospermo *in vivo*. En Higuera la regeneración de plántulas a partir de explantes vegetativos están estrechamente vinculados a tejidos de plántulas jóvenes (Athma y Reddy, 1983; Ganesh Kumari

et al. 2008). Para citar algunos casos, la multiplicación de brotes obtenidos a partir de meristemos en muchos estudios está entre 1 y 5.2 brotes por explante (Athma y Reddy, 1983; Molina y Schobert, 1995). Para la obtención de mayores brotes a partir de explantes meristemáticos se logró mediante el uso de citoquininas (Sujatha and Reddy 1998) y se reportaron tasas entre 22 y 46.7 de formación de brotes por explante, lo cual demostró los efectos de las citoquininas en los explantes meristemáticos.

Para el establecimiento de un medio de cultivo óptimo para el crecimiento de higuierilla generalmente se usa el medio basal Murashige y Skoog (MS) en diferentes concentraciones, el cual ha funcionado para el crecimiento y regeneración de varios tejidos de la planta de higuierilla, principalmente en hipocótilos, endospermo y callos (Ahn et al. 2007; Sujatha, Makkar, and Becker 2005; Sujatha and Reddy 1998). Aunque se emplee el cultivo de plántulas de higuierilla *in vitro* a partir de semilla, existe un limitante: la baja tasa de germinación de las semillas que usualmente no excede el 50% (Mederos Molina and Schobert 1995). Es importante mencionar que higuierilla tiene un comportamiento recalcitrante en condiciones *in vitro*, y solo pocos casos se han reportado de regeneración exitosa de brotes adventicios durante investigaciones de mejoramiento genético (Sujatha, Reddy, and Mahasi 2008b; Baghel and Bansal 2015; Ganesh Kumari, Ganesan, and Jayabalan 2008). Para mejorar la fase de la propagación de estas plantas recalcitrantes, se parte de un tejido poco diferenciado, como lo son hipocótilos o epicótilos, que son fundamentales para inducir organogénesis (A. Sarvesh 1992)

Fue por ello que investigadores del Departamento de Ciencias Biológicas y del grupo de investigación CIBIOP, iniciaron en el año 2015 un programa de investigación para el mejoramiento genético de plantas oleaginosas, entre ellas la higuierilla. Como parte del mencionado programa de investigación, se generó de manera exitosa, una metodología para regeneración de plantas de higuierilla usando para ello secciones de epicótilos obtenidos de plántulas *in vitro* (Gil-Correal et al. 2019). En dicha investigación se reportó la formación de 4.3 brotes por explante con una frecuencia de formación de brotes del 75.56%. Para la regeneración de estas secciones de epicótilos utilizaron como medio basal Lloyd and McCown's Woody plant basic médium (WPM) suplementado con TDZ y zeatina.

1.3.2. Cultivo de callos

El término de callo se refiere a un crecimiento continuo, acelerado y de apariencia desorganizada de células obtenido a partir de un determinado tejido (hoja, raíz, hipocótilo, endospermo, etc) (Mroginski and Roca 1991). La formación de callo comienza con el aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, las cuales posteriormente se desdiferencian a través de la señalización de hormonas vegetales, principalmente de auxinas y citoquininas (Ikeuchi, Sugimoto, and Iwase 2013).

Es importante el estado fisiológico y la edad de la planta donadora del callo, siendo recomendable utilizar plantas jóvenes y con crecimiento activo (Hurtado M. and Merino M. 1987). El lugar o sitio para el comienzo de la proliferación de los callos generalmente está situado en la superficie que fue cortada, siendo solo un pequeño porcentaje de células las que contribuye a la formación de callo (Perez Ponce et al. 1998). La formación de callos también puede lograrse a partir de protoplastos, recae un gran interés al querer desarrollar plantas con modificaciones genéticas que puedan ir desde una fase de transformación en protoplastos hasta llegar a plantas intactas (Boyes, Zapata, and Sink 1980). Inicialmente, los protoplastos al estar en presencia de citoquininas y/o auxinas pueden regenerarse en células alargadas y parenquimatosas, y el contacto continuo de estas células en medios que contienen éstas fitohormonas generara la formación de callos (Fehér 2019)

El callo puede tener diferentes apariencias y color dependiendo de la especie o genotipo con que se trabaje, así como las condiciones de cultivo *in vitro*. Se pueden presentar callos que carecen de pigmentación, mientras otros pueden ser de diferentes tonos de verde, amarillo, café o rojo. El tipo y grado de pigmentación está influenciado por factores nutricionales y ambientales, y se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas (Hurtado M. and Merino M. 1987). Su apariencia puede ser acuosa (friable) o compactos, secos y nodulares (Ikeuchi, Sugimoto, and Iwase 2013). Los callos después de formados pueden multiplicarse con subcultivos cada 15-45 días dependiendo de la especie, separando estos en pequeñas fracciones con tamaño entre 2-5 mm. Generalmente se emplea el mismo medio de cultivo de formación para la multiplicación (Mroginski and Roca 1991).

Todavía es una pregunta de cómo los callos perciben y transducen señales endógenas y ambientales y como inducen o mantiene la diferenciación y dediferenciación celular. El entender como los mecanismos genéticos y epigenéticos se integran para la diferenciación y la dediferenciación celular ayudará a que no solo los protocolos se centren en pocas especies, sino que este conocimiento ayude a diseñar herramientas moleculares para manipular sistemáticamente la regeneración de órganos (Ikeuchi, Sugimoto, and Iwase 2013).

1.3.3. Regeneración *in vitro*

Para el proceso de regeneración se necesita que las células sean competentes y por lo tanto receptivas a procesos de dediferenciación (organogénesis indirecta) y posteriormente diferenciación celular que permita la formación de nuevos brotes. Cuando la formación de brotes es a partir del explante sin formación de callo, es llamada organogénesis directa. La organogénesis directa e indirecta es utilizada frecuentemente para aumentar las tasas de multiplicación y para obtener plantas modificadas genéticamente. Existe muchos factores que pueden influir en el proceso de regeneración como el explante, el medio basal, los reguladores de crecimiento, las condiciones de cultivo y condiciones ambientales (Mroginski and Roca 1991)

Métodos replicables y eficientes de regeneración de plantas *de novo* son fundamentales para la aplicación de transformación genética y tecnologías de edición del genoma. La embriogénesis somática es el proceso morfogénico más frecuentemente empleada para la regeneración de plantas transgénicas. Aunque es una técnica efectiva y se obtienen masivamente plantas cuando la metodología es estandarizada, este método requiere de múltiples subcultivos en medios específicos para cada etapa de la embriogénesis y requiere mucho tiempo para la regeneración. Por lo tanto, es importante el desarrollo de otras vías de regeneración como la organogénesis para esta especie. La regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta ha sido aplicada con éxito en varias especies de la familia euforbiáceas (Aishwariya et al. 2015; Guohua 1998; Soares et al. 2016; Deore and Johnson 2008). En higuera ha habido pocos reportes de este tipo, entre ellos está lo reportado por Ganesh Kumari, et al, 2008, el cual evaluó la de regeneración a partir de cotiledones.

1.3.4. Aislamiento de protoplastos

El termino protoplastos se refiere a componentes vivos de las células vegetales que están rodeados sólo por la membrana plasmática. Muchos protoplastos pueden resintetizar la pared celular, dividirse, formar colonias e incluso regenerar plantas (Mroginski and Roca 1991). El aislamiento de protoplastos de plantas fue reportado por primera vez en la especie *Lycopersicum esculentum* en 1960 y se pretendía estudiar el efecto de enzimas que degradaran pared celular utilizando la raíz de plántulas de esta especie (Cocking 1960).

Para el caso de *Ricinus communis* se ha reportado la obtención de protoplastos a partir de células del mesófilo de plantas *in vitro* (Tudses, Premjet, and Premjet 2014, 2015; Y. Liu et al. 2019), hipocótilos (Chandran and Sujatha, 1996), endospermo (Nishimura and Beevers 1978) y callos (Tudses, Premjet, and Premjet 2014)

Cabe mencionar que, de los tejidos anteriormente enunciados, el hipocótilo y el mesófilo son los tejidos más usados para el aislamiento de protoplastos (Q. Hu, Andersen, and Hansen 1999). El procedimiento más usado para aislar protoplastos de mesófilo consiste en tratar al tejido con una mezcla de enzimas degradantes de la pared, que en general son celulasas, hemicelulasas y pectinasas, en soluciones apropiadas y con estabilizadores osmóticos. Por su mecanismo de acción este método tiene varias ventajas, como son la de obtener un mayor número de protoplastos viables por unidad de tejido (Mroginski and Roca 1991).

Para la obtención de protoplastos a partir de callos o suspensiones celulares se deben utilizar células que se encuentren en la fase exponencial de crecimiento, ya que éstas tienen paredes celulares más finas. Por medio de una mezcla enzimática de celulasa, pectinasa y a veces hemicelulasa (las cuales disuelven respectivamente la celulosa, la pectina y la hemicelulosa), se obtienen protoplastos (Pierik 1990)

Una de las características que hacen importante el cultivo de protoplastos es que, por estar aislado del conjunto de células, cada protoplasto puede ser usado como un sistema celular individual, el cual provee un sistema experimental para un amplio rango de estudios bioquímicos, fisiológicos y biofísicos (Mroginski and Roca 1991). Por otro lado, los protoplastos poseen la habilidad de fusionarse con otras sin tener en cuenta su origen (Bhojwani and Razdan 1996), por esto se ha convertido en un material interesante para el mejoramiento de plantas a través de técnicas de manipulación genética, tales como, hibridación somática, hibridación (fusión de citoplasma), transformación de plantas o transferencia directa de genes y selección *in vitro* utilizando generalmente como método PEG (polietilenglicol) por ser económico, su simplicidad y eficiencia, además que no interfiere con la viabilidad de protoplastos (Lian et al. 2012; C. S. Lin et al. 2018; Nanjareddy et al. 2016; Wu et al. 2017).

Muchos protoplastos pueden resintetizar la pared celular, dividirse, formar colonias e incluso regenerar plantas. El proceso de regeneración de la pared celular depende de la especie. Según lo reportado por (Cui et al. 2019) para 9 especies del género *Kalanchoë*, en solo 24 horas los protoplastos regeneraron la pared celular, y la primera división fue entre el tercer y séptimo día, mientras para la especie *Ulmus minor* Mill (Conde and Santos 2006) solo hasta el día once, 21% de los protoplastos regeneraron la pared celular. Para el cultivo de protoplastos generalmente se usan cajas de petri en medio líquido o semisólido. El medio líquido tiene la desventaja del aislamiento de las colonias, mientras que en el medio semisólido los protoplastos inmovilizados producen clones celulares que se pueden subcultivar (Mroginski and Roca 1991)

Muchos protocolos sobre aislamiento de protoplastos y purificación han sido publicados para optimizar la producción y reproducibilidad. Sin embargo, a pesar de que ha pasado décadas desde que se experimentó el aislamiento de protoplastos, la eficacia de tales protocolos o las combinaciones enzimáticas usadas están limitada a unas pocas especies de plantas (Rao and Prakash 1995). Estas restricciones pueden estar influenciada por muchos factores como la composición y el grosor de la pared celular, la temperatura, la duración de la incubación enzimática, el pH de la solución, la agitación y la solución osmótica (Davey et al. 2005).

1.4. Materiales y métodos.

El presente proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal y el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.

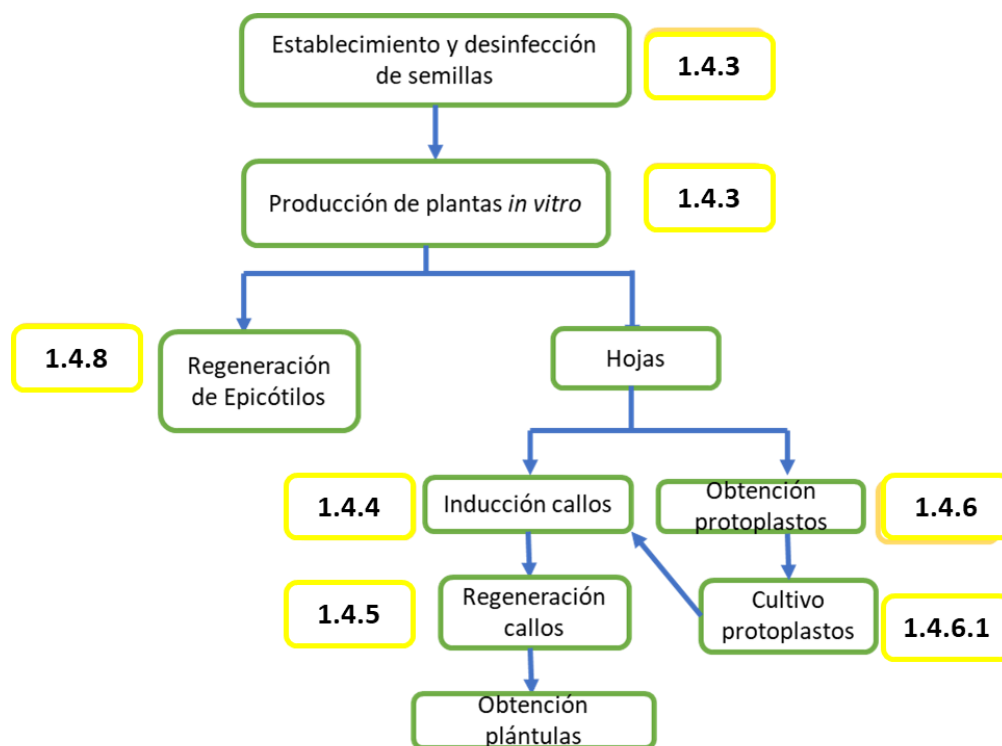
1.4.2. Material vegetal.

Como material vegetal para obtener los explantes necesarios para los experimentos a nivel *in vitro*, se germinaron plántulas de *R. communis*-02 (VERC-02), a partir de semillas pertenecientes al banco de germoplasma de la Corporación Colombiana de investigación agropecuaria (Agrosavia), material vegetal obtenido mediante acuerdo de transferencia de materiales (ATM). A partir de estas plántulas crecidas en condiciones *in vitro*, se tomó hojas para la inducción de callos y obtención de protoplastos, ambas metodologías para la regeneración de plántulas. Para una mejor comprensión de la metodología de este capítulo ver figura 1.

1.4.1.1 Composición de los medios de cultivo y condiciones de crecimiento de callos de *R. communis*.

Se utilizó WPM (Lloyd and McCown 1980) como medio de cultivo basal para las diferentes fases del cultivo *in vitro*. Los medios fueron suplementados con 30 g/L sacarosa. Se les adicionó como agente antioxidante 1 g/L de carbón activado para el cultivo de plantas *in vitro*, para callos y protoplastos se usó 150g/L de ácido cítrico. Como gelificante se utilizó 1.8g/L de phytigel (Sigma-Aldrich, USA) para los medios sólidos. Por otro lado, los medios se suplementaron con 150 g/L de caseína hidrolizada, 0,5mg/L de Sulfato de cobre, 50 mg/L de glutamina, 25 mg/L de adenina, 15 mg/L de arginina y 20 ml/L agua de coco. El pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH 1N y HCl 1N antes de autoclavar. La esterilización de los medios de cultivo se realizó en autoclave (Raypa, Barcelona, España) a 120 grados centígrados con 20 libras de presión durante 20 minutos. Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de crecimiento a una temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1$ y a un fotoperiodo de 12 horas luz, con una intensidad lumínica de aproximadamente 3.000 lux.

Figura 1. Representación gráfica de la metodología utilizada en el capítulo No 1, para establecimiento y regeneración de plantas de *R. communis*. Los recuadros amarillos indican la sección específica en “materiales y métodos” donde se describen mayores detalles.



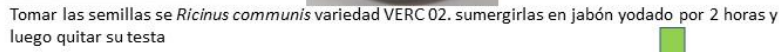
1.4.3. Desinfección y establecimiento *in vitro* de plántulas de higuierilla a partir de semillas

Semillas de Higuierilla de la variedad VERC 02 (Variedad experimental *Ricinus communis*) fueron proveídas por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia, antes CORPOICA). De estas semillas, se retiraron la testa y la cutícula, y posteriormente en la cámara de flujo laminar, se sumergieron en etanol al 70% por 30 segundos, se lavaron con agua destilada estéril, luego se dejaron en cloruro de mercurio (HgCl_2) al 0.1% por 3 min, posteriormente se hicieron 7 lavados consecutivos con agua destilada estéril. Finalmente, las semillas se dejaron en un medio de cultivo básico en oscuridad por 15 días, para su germinación. (Ver figura 2)

Las plántulas germinadas de las semillas se pasaron a un medio de elongación que consistía en medio basal WPM (Lloyd and McCown, 1981), caseína (150 mg/L), glutamina (50 mg/L), adenina (25 mg/L), arginina (15 mg/L), sucrosa (30g/L), sulfato cúprico (CuSO_4) (0.5 mg/L), carbón activado (1.5 g/L) y fitagel (1.8 g/L), con concentraciones hormonales de ácido indol-3-butírico (IBA) (1.5 mg/L) y Kinetina (2 mg/L), se ajustó a un pH de 5.7 ± 0.1 con 1N NaOH y 1N HCL, el medio se esterilizó en autoclave a 120°C y 20 lbs de presión (0.1 MPa) por 20 min. Las plántulas

se dejaron con un fotoperiodo natural en un cuarto de crecimiento del laboratorio de biotecnología vegetal de la universidad EAFIT a 24°C, por un periodo de dos semanas (Gil-Correal et al. 2019).

Al momento de utilizar en esta investigación la metodología para la regeneración de plantas a partir de epicótilos reportada por (Gil-Correal et al. 2019), el porcentaje de germinación fue del 53% y el porcentaje de contaminación de las células fue del 23.6%, cifras que difieren un poco de lo reportado por estos autores, con porcentajes de germinación y de contaminación del 71.7% y 46.7% respectivamente (Gil-Correal et al 2019). Se atribuyen las diferencias en estos porcentajes a la variación que se hizo en la desinfección de las semillas, ya que se realizó utilizando cloruro de mercurio (HgCl_2). La decisión de cambiar la metodología de desinfección de semillas se basó en la alta contaminación de microorganismos endófitos, y el HgCl_2 ha resultado ser un desinfectante muy efectivo para el control de la contaminación de hongos y bacterias endógenas (Zhang et al. 2016), pero es un producto toxico que debe ser utilizado con cuidado. El porcentaje de germinación puede verse disminuido un poco puesto que el cloruro de mercurio de fitotóxico cuando llega a tener contacto con el endospermo y esto se ve reflejado en la reducción de germinación de la semilla (Mahmoud and Al-Ani 2016).



Quitar cutícula a las semillas y realizar el proceso de desinfección en cámara de flujo laminar

1.4.4. Inducción de Callos de *R. communis*

A partir de las plantas obtenidas *in vitro* (descrito en la sección 1.4.2), se retiraron hojas jóvenes para ser utilizadas como explantes hacia la inducción de callo. Se cortaron en segmentos de 1cm² aproximadamente y se colocaron con el envés hacia el medio.

1.4.4.1. Inducción y multiplicación de callos

Con el objetivo de obtener callos friables adecuados para la obtención de protoplastos, se utilizaron como explantes, para la etapa de inducción de callo, porciones de hojas de las plantas cultivadas *in vitro*. Hojas jóvenes se cortaron en segmentos de 1cm² aproximadamente y se colocaron con el envés hacia el medio (figura 3A). El medio de cultivo WPM fue suplementado con diferentes concentraciones y combinaciones de la auxina ANA (ácido naftalenacético) y las citoquininas Kinetina y BAP (6-N-Bencilaminopurina) y un control (sin hormonas), de acuerdo con lo reportado por Ganesh et al., (2008); Sujatha et al., (2008) y teniendo en cuenta la experiencia del personal del laboratorio (Tabla 1).

El tamaño de la muestra fue de 5 cajas de Petri, cada una con 3 discos de hoja por tratamiento. Las variables respuesta que se evaluaron fueron presencia o no de callo, porcentaje de callo y tipo de callo (friable o compacto) en ausencia de luz, 45 días después de la siembra. En evaluaciones previas en cuanto a las condiciones de luz y oscuridad, solo la oscuridad tuvo un efecto marcado en la inducción de callo, por lo tanto, solo se escogió esta condición para evaluar los tratamientos hormonales.

Tabla 1. Concentraciones de hormonas utilizadas para inducción de callo

Tratamientos	Regulador de crecimiento	[mg/L]
1	BAP	1.0
2	BAP	1.5
3	BAP	2.0
4	Kinetina	1.0
5	Kinetina	1.5
6	Kinetina	2.0
7	Kinetina + BAP + ANA	2.0+1.0+1.0
8	Kinetina + BAP + ANA	2.0+2.0+0.5
9	Kinetina + BAP + ANA	1.0+2.0+0.5
10	Kinetina + BAP + ANA	1.0+1.0+0.5
Control	-----	-----

1.4.5. Inducción de brotes a partir de callos de *R. communis*

Los callos obtenidos en la sección 1.4.3.1 fueron cultivados para que estos se tornaron de textura nodular y así propiciar la regeneración de plántulas vía organogénesis. Para esto se cultivaron los callos en diferentes concentraciones de BAP (2-4mg/L), ANA (0.5-2mg/L) y kinetina (1-3mg/L), siendo la mejor concentración (Tabla 2). Luego, se evaluaron varias hormonas

en diferentes concentraciones bajo condiciones de fotoperiodo (12h luz /12 horas oscuridad) para la regeneración de brotes vía organogénesis indirecta (Tabla 3).

Se identificó los callos de naturaleza organogénica cuando eran de color verde con textura compacta (matriz 1, Tabla 2). Estas porciones organogénicas fueron aisladas y subcultivados en el mismo medio. En los tratamientos donde los callos eran de color verde friable, compacto o friable de color café y sin color no se seleccionaron y fueron descartados. El callo organogénico fue subcultivado cada 15 días para su maduración (matrices 2, 3 y 4, Tabla 3).

Tabla 2. Matriz #1: Concentración de fitohormonas evaluadas para la inducción de callo nodular en *Ricinus communis*

Matriz 1		
Tratamiento	Regulador de crecimiento	[mg/L]
1	BAP+ANA	2+1
2	BAP+ANA	3+1.5
3	BAP+ANA	4+2
4	ANA+KINETINA	0.5+1
5	ANA+KINETINA	1+2
6	ANA+KINETINA	1.5+3
7	BAP	2
8	BAP	3
9	BAP	4
10	BAP	1
11	BAP	2
12	BAP	3

Tabla 3. Concentraciones de fitohormonas en diversas matrices utilizadas para formación de brotes en *Ricinus communis*

	Tratamientos	Regulador de crecimiento	[mg/L]
Matriz 2	1	TDZ+ANA	0.5+0.1
	2	TDZ+ANA	1.0+0.3
	3	TDZ+ANA	1.5+0.5
	4	TDZ+ANA	2.0+0.6
	5	TDZ+ANA	2.5+0.8
Matriz 3	1	TDZ+ANA+BAP	0.5+0.1+0.5
	2	TDZ+ANA+BAP	1.0+0.3+0.5
	3	TDZ+ANA+BAP	1.5+0.5+0.5
	4	TDZ+ANA+BAP	2.0+0.6+0.5
	5	TDZ+ANA+BAP	2.5+0.8+0.5
Matriz 4	1	mT	0.5
	2	mT	1.0
	3	mT	1.5
	4	mT	2.0
	5	mT	3.0
	6	mT+ANA	0.5+0.1
	7	mT+ANA	1.0+0.3
	8	mT+ANA	1.5+0.4
	9	mT+ANA	2.0+0.5
	10	mT+ANA	3.0+0.8
	11	mT+ANA+BAP	0.5+0.1+0.5
	12	mT+ANA+BAP	1.0+0.3+0.5
	13	mT+ANA+BAP	1.5+0.4+0.5
	14	mT+ANA+BAP	2.0+0.5+0.5
	15	mT+ANA+BAP	3.0+0.8+0.5
	Control	-----	-----

1.4.6. Aislamiento de protoplastos

Para la obtención de protoplastos a partir de mesófilo, inicialmente se tomaron plantas *in vitro* de higuera (metodología descrita en la sección 1.4.2) y se dejaron en oscuridad por 24 horas. En cámara de flujo laminar se cortaron aproximadamente 0.3 gramos de hojas jóvenes (pesadas en balanza analítica) y se cortaron en tiras delgadas (2mm) usando un bisturí. Luego este material

vegetal fue pre-plasmolizado en 20ml de solución I, previamente esterilizada con filtro de 0.22 micras, que contenía 3mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.7mM de KH_2PO_4 con 0.5M de manitol y 5mM de MES (2N ácido etanosulfónico morfolino) a un pH de 5.6, en oscuridad y en agitación a 45 rpm a 25°C por 1 hora. Luego para encontrar el tiempo de incubación y la concentración de enzimas adecuado para obtener una cantidad deseada y viabilidad por encima del 80%, se procedió a evaluar la concentración de diferentes enzimas y tiempo de exposición (Tabla 4), a un pH de 5.6, previamente esterilizada con filtro de 0.22 micras por 18 horas y en agitación a 50 rpm a 29°C. Las hojas digeridas se filtraron con un tamiz (cell dissociation sieve tissue grinder kit, sigma) de 100 mesh (140µm) previamente esterilizado en autoclave y fueron colectado en tubos Falcon para centrifugar (Rotina 380 Hettich) por 5min a 1000rpm. El pellet de protoplastos se resuspendió en 10ml de Plant protoplast digest/wash solution de Sigma-Aldrich, y se centrifugó por 5min a 1000rpm. Se repitió este último paso de centrifugación una vez más. Para la obtención de protoplastos a partir de callos, los cuales se indujeron de hojas de plantas cultivadas *in vitro* (metodología descrita en la sección 1.4.3), se tomaron en cámara de flujo laminar 0.8 gramos (pesadas en balanza analítica). Posteriormente, se siguieron los mismos pasos usados a partir de mesófilo. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

La densidad de población de los protoplastos fue calculada en número de protoplastos/ml utilizando una cámara de Neubauer (Boeco-Germany), en microscopio (Zeiss Primo Star). La fórmula empleada fue: $X \cdot 10^4 = \text{protoplastos/ml}$. Donde X es el número promedio de protoplastos de los campos evaluados y 10^4 teniendo en cuenta la profundidad de la cámara de Neubauer (0.100mm). Para determinar la viabilidad de los protoplastos se utilizó el método de tinción con el colorante azul de Trypan (0.4%), el cual permite diferenciar las células viables (no teñidas) de las no viables (teñidas) (Tudses, Premjet, and Premjet 2014)

Tabla 4. Mezcla enzimática y tiempos de incubación evaluados para el aislamiento de protoplastos a partir de mesófilo en *R. communis*

Tratamientos	Mezcla enzimática (p/v)	Tiempo incubación (h)
T1	Celulasa <i>Aspergillus niger</i> 1% (Sigma-Aldrich, USA)	8, 10, 12, 14, 16 y 18
	Pectinasa <i>Aspergillus niger</i> 1% (Sigma-Aldrich, USA)	
	Hemicelulasa <i>Aspergillus niger</i> 0.15% (Sigma-Aldrich, USA)	
T2	Celulasa <i>Aspergillus niger</i> 2% (Sigma-Aldrich, USA)	8, 10, 12, 14, 16 y 18
	Pectinasa <i>Aspergillus niger</i> 2% (Sigma-Aldrich, USA)	
	Hemicelulasa <i>Aspergillus niger</i> 0.3% (Sigma-Aldrich, USA)	
T3	Celulasa <i>Aspergillus niger</i> 1.5% (Sigma-Aldrich, USA)	8, 10, 12, 14, 16 y 18
	Peptinase <i>Rhizopus sp</i> 0.4% (Sigma-Aldrich, USA)	
T4	Cellulase “Onozuka” R-10 1.6% (Yakult Pharmaceutical ind. Co. Ltd, Japan)	14,16 y 18
	Macerozyme R-10 0.8% (Yakult Pharmaceutical ind. Co. Ltd, Japan)	

1.4.6.1. Cultivo de protoplastos

Los protoplastos obtenidos fueron inicialmente cultivados en medio líquido sin reguladores de crecimiento y aumentando la concentración de la sacarosa a 60g/L e incubados a 25°C aproximadamente en oscuridad por 7 días. Luego fueron cultivados en medio semisólido suplementado con 2mg/L de kinetina, 1.0mg/L de BAP (Bencil amino purina) y 1.0 mg/L de ANA (ácido naftalenacético) en oscuridad por 45 días para la inducción de callo. Para este procedimiento se hizo una mezcla de la suspensión de protoplastos con el medio de cultivo semisólido a una temperatura aproximadamente de 36°C, de tal manera que se generara una mezcla donde los protoplastos quedaran embebidos en la matriz del medio. Después, los pequeños callos que se visualizaban fueron subcultivados acorde a la metodología descrita en la sección 1.4.3.1.

1.4.7. Diseño experimental y análisis estadístico de las matrices para organogénesis callos de Higuierilla y para obtención de protoplastos.

El diseño para la formación de brotes a través de organogénesis indirecta en callos de higuierilla consistió en un diseño unifactorial, en el cual el factor de estudio fueron los tratamientos evaluados y cada nivel de los tratamientos eran las diferentes concentraciones hormonales que tenía el medio de cultivo. Para las matrices, cada uno de los tratamientos tenía 10 réplicas y dentro de cada réplica habían 3 pseudoreplicas. Cada uno de los callos se eligió aleatoriamente para ser sometidos al proceso de formación de brotes.

Para el análisis estadístico, se contemplaron como variables de respuesta lo siguiente. En la matriz 1 se analizaba crecimiento (cm), peso (g), coloración y textura. Para las matrices 2, 3 y 4 las variables respuesta solo fueron coloración y textura. Estos resultados se analizaron estadísticamente por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% y la diferencia entre las medias de los tratamientos fue estimada con el análisis de rangos múltiples LSD usando el software Statgraphics Centurion XVIII (Statgraphics Technologies, Inc. USA). Para la evaluación de las variables categóricas como lo es color y textura, se realizaron tablas de contingencia y éstas fueron evaluadas por medio del test de Chi cuadrado con un nivel de confianza del 95%, esto se hizo con la finalidad de establecer diferencias entre los tratamientos de las diferentes matrices.

El diseño para el aislamiento de protoplastos de higuierilla consistió en un diseño unifactorial, en el cual el factor de estudio fueron los tratamientos evaluados y cada nivel de los tratamientos eran las diferentes concentraciones enzimáticas que tenían las soluciones de digestión y el tiempo de digestión. Para cada uno de los tratamientos evaluados se realizaron 3 réplicas.

Para el análisis estadístico, se contemplaron como variables de respuesta el número de protoplastos obtenido por ml de solución y el porcentaje de viabilidad. Estos resultados se analizaron estadísticamente por medio de un análisis de varianza (ANOVA-one way) con un nivel de confianza del 95% y la diferencia entre las medias de los tratamientos fue estimada con el análisis de rangos múltiples LSD usando el software Statgraphics Centurion XVIII.

1.4.8. Establecimiento *in vitro* de *Ricinus communis* para obtención de epicótilos y la subsecuente regeneración de plántulas.

De manera paralela, a partir de las plantas obtenidas *in vitro* (acorde a la metodología descrita en la sección 1.4.2), se obtuvo epicótilos y fueron usados para establecer una metodología de regeneración de plantas a partir de los mismos. Estos epicótilos fueron utilizados como material vegetal para transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Capítulo 3).

1.4.8.1. Inducción de brotes a partir de epicótilos.

Se tomaron plántulas de dos semanas que estaban en medio de elongación y se cortó la raíz, hojas y ápice. Posteriormente se ubicó en un medio basal WPM (2.4 g/L) suplementado con sucrosa (45 g/L), caseína (150 g/L), agua de coco (10 ml/L), ácido cítrico (50 mg/L), sulfato cúprico (0.5 mg/L), glutamina (50 mg/L), Arginina (14.8 mg/L), Adenina (24.8 mg/L), nitrato de plata (AgNO_3) 20 μm , Fitagel (1.8 g/L) y carbón activado (1.5 g/L). Este medio contenía 6-N-Bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA) y ácido giberélico (GA_3) en las siguientes concentraciones respectivamente 3 mg/L, 1.5 mg/L y 1 mg/L. El medio fue suplementado con antibióticos de selección, Higromicina B (10 mg/L) (PhytoTechnology Laboratories®, USA) y cefotaxime (250 mg/L) (PhytoTechnology Laboratories®, USA), este último se usó para combatir la posible contaminación por *Agrobacterium tumefaciens* en el medio de cultivo. Cada epicótilo se sub-cultivó cada dos semanas. Nota. Después de los primeros 15 días del primer subcultivo, el medio donde se pasaba el epicótilo se le aumentaba la concentración de Higromicina B a 20 mg/L.

1.5. Resultados

1.5.1. Inducción y multiplicación de callos.

Durante la inducción de callo a partir de mesófilo de *Ricinus communis* se obtuvo un porcentaje promedio por explante y el tipo de callo, presentados en la tabla 5. Allí es posible evidenciar que con los diferentes tratamientos el porcentaje de callos obtenidos osciló entre 0% y 77.22%, con callos que presentaban características nodulares y friables. De los tratamientos evaluados, en el tratamiento 4 solo ocurrió un encorvamiento de la hoja y hubo formación de pequeños puntos de callo (figura 3B). En el resto de los tratamientos hormonales, el callo solo se formó en los cortes realizados en las hojas, con mayor proliferación en el tratamiento 9 (figura 3C) (Tabla 5).

De los 11 tratamientos evaluados para la inducción de callo, el análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas entre ellos, es decir, el porcentaje de callo en cada tratamiento es diferente. Los tratamientos influyeron de manera independiente en el porcentaje de callo producido sobre los explantes de hoja, siendo el tratamiento 9 el que formó el mayor porcentaje de callo sobre las hojas (77%), seguido del tratamiento 7 formando un 56% de callo. Aunque el porcentaje de inducción de callo en estos últimos tratamientos presentaron diferencias significativas, siendo el tratamiento 9 el que alcanzó el mayor porcentaje de callo, características tan importantes para el objetivo final que es la obtención de protoplastos, como la friabilidad y la coloración de los callos, fueron los indicadores de respuesta que más tuvo peso para decidir sobre los tratamientos, siendo el tratamiento 7 el mejor.

Tabla 5. Porcentaje de inducción de callo formado a partir de hojas en diferentes tratamientos hormonales.

Tratamientos	Porcentaje promedio de callo por explante	Tipo de callo
1	43.33 ^b	Nodular
2	26.39 ^c	Nodular
3	16.39 ^d	Nodular
4	9.72 ^d	Friable
5	18.06 ^d	Friable
6	34.58 ^c	Nodular
7	55.56 ^b	Friable
8	0 ^e	No formación
9	77.22 ^a	Nodular
10	27.08 ^c	Friable
Control	0 ^e	No formación

Los valores asociados con letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

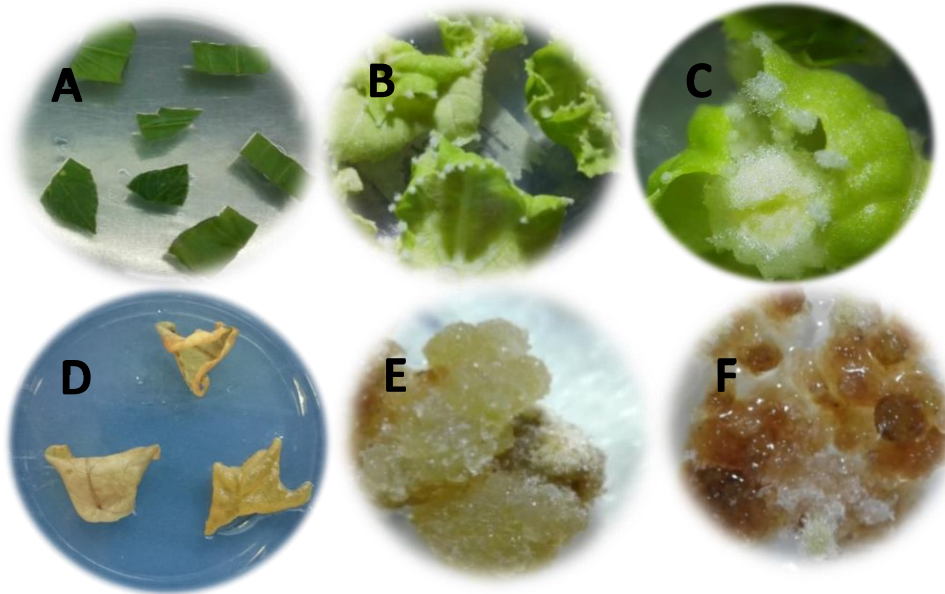
De acuerdo con los resultados y análisis obtenidos en la etapa de inducción de callo, para continuar con la fase de multiplicación se eligieron los tratamientos 7, 9 y 10 y la condición siguió siendo la oscuridad. Según el análisis estadístico, el tratamiento que tuvo mayor efecto sobre la multiplicación de los callos, es decir, el que generó una mayor diferencia de peso en los callos, fue el 9, pero al evaluar las características se comprobó que, aunque estos callos eran más grandes seguían siendo nodulares con consistencia dura. Por el contrario, el tratamiento 7 luego de la segunda multiplicación, el callo presentó una mayor friabilidad (figura 3E) (Tabla 6), por lo tanto, se decidió escoger el tratamiento 7 para la multiplicación de los callos fuente de material para el aislamiento de protoplastos.

Tabla 6. Diferencia de peso (g) y tipo de callo en cada uno de los 3 tratamientos evaluados en *R. communis*

Tratamientos	Peso (g)	Tipo de callo
7	0.71 ^b	friable
9	0.9 ^a	nodular
10	0.32 ^c	friable

Los valores asociados con letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Figura 3. A. Hojas jóvenes de plantas *in vitro* de *R. communis* sembradas por el envés. B. Encorvamiento de la hoja con formación de pequeños puntos de callos en tratamiento 2. C. Proliferación de callo en el tratamiento 1. D. Necrosis de las hojas en el tratamiento 8. E. Proliferación de callo en la fase de multiplicación de callos. F. Fenolización de algunos callos en etapa de multiplicación.



1.5.1.1. Inducción de brotes a partir de callos nodulares

Al conseguir una cantidad apropiada de callos (a partir de hojas) mencionados anteriormente, se cultivaron los callos para que estos se tornaron de textura nodular y así adecuar los callos para la regeneración vía organogénesis. Diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento se utilizaron para lograr las variables de respuesta deseadas (ver tabla 2 y 3).

Los callos fueron expuestos a las condiciones mencionadas en la matriz 1, durante cuatro meses, con sub-cultivo cada 15 días. En la tabla 7 se resume el resultado para cada una de las variables evaluadas durante ese periodo.

Tabla 7. Respuesta de los callos de *R. communis* a diferentes tratamientos hormonales para la regeneración.

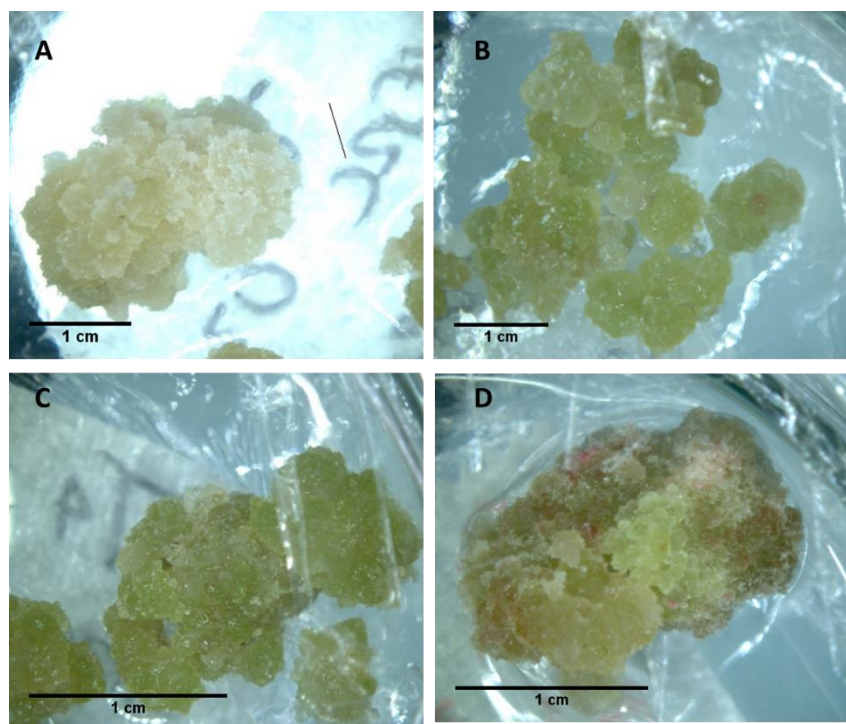
Matriz 1

Tratamiento	Crecimiento (cm)	Peso (g)	Coloración	Tipo de callo
1	1.947	2.823	Café	Disgregado
2	1.678	3.294	Café	Disgregado
3	1.486	2.698	Verde café	Duro compacto
4	2.019	3.15	Verde	Friable
5	1.94	3.846	Café	Duro compacto
6	1.69	3.004	Verde café	Duro compacto
7	1.908	3.636	Verde café	Disgregado
8	0.765	2.083	Verde café	Disgregado
9	1.276	2.460	Café	Disgregado
10	1.07	2.294	Café	Disgregado
11	0.998	2.111	Café	Disgregado
12	0.974	2.336	Café	Disgregado

Los tratamientos 3, 5 y 6 fueron los que mejor respondieron con respecto a la formación de callos verdes (algunos con tonos un poco café) con consistencia dura y compacta. Para la etapa de formación de callos nodulares, en cada uno de los tratamientos de la tabla 2, se obtuvieron tamaños variables de callos que estaban entre 0.765 cm y 1.019 cm, con respecto al peso, el tratamiento 8 fue el que mostro el menor valor (2.083 g) y el tratamiento 5 logro un mayor peso con 3.846 g. La coloración se catalogó en 3 colores, Café, verde café y verde, de los cuales para la mayoría de los tratamientos fue café (tratamientos 1, 2, 5, 9, 10, 11 y 12) y el único que logro la coloración verde deseada fue el tratamiento 4. Con respecto al tipo de callo, los rangos de textura se encontraban entre friable y duro compacto, solo 3 tratamientos lograron la textura deseada de duro compacto (tratamientos 3, 5 y 6)

El aspecto de los callos en la matriz 1, se observa en la figura 4, y la imagen que corresponde a la letra D, muestra un callo con las condiciones deseadas para esta matriz en particular, que es un tipo de callo verde con textura dura y compacta

Figura 4. Formación de callos compactos de la matriz 1. A callo embriogénico friable. B y C callos disgregados. D callo duro compacto.



Después de seleccionar los callos con las condiciones deseadas de coloración y textura, estos se someten a las matrices 2, 3 y 4 durante 6 meses con sub-cultivos cada 15 días, para la formación de brotes (ver tabla 3). Los resultados de cada uno de estos tratamientos se reflejan en la siguiente tabla.

Tabla 8. Respuesta de los callos a diferentes tratamientos hormonales para la formación de brotes.

Matriz	Tratamientos	Coloración	Tipo de callo
Matriz 2	1	Café	Friable
	2	Café	Friable
	3	Verde-café	Duro compacto
	4	Verde- café	Friable
	5	Verde-café	Duro compacto
Matriz 3	1	Verde-café	Duro compacto
	2	Verde-café	Duro compacto
	3	Verde-café	Duro compacto
	4	Verde-café	Friable
	5	Verde-café	Duro compacto
Matriz 4	1	Verde-café	Duro compacto
	2	Verde-café	Duro compacto
	3	Verde-café	Duro-compacto
	4	Verde-café	Duro-compacto
	5	Verde-café	Friable
	6	Verde-café	Duro-compacto
	7	Verde-café	Duro-compacto
	8	Verde claro	Duro-compacto
	9	Verde-café	Duro-compacto
	10	Verde-café	Duro-compacto
	11	Verde-café	Friable
	12	Verde-café	Duro-compacto
	13	Verde-café	Duro-compacto
	14	Verde-café	Friable
	15	Verde-café	Duro-compacto
Control		-----	-----

La tabla 8 presenta los resultados después de someter los callos elegidos en la matriz #1 a las concentraciones de fitohormonas de la tabla 3. Al momento de evaluar el parámetro de coloración, se encontraron callos que tenían coloración café y otros con tonos verdes con pequeñas transiciones al color café, este último color fue el que predominó en la mayoría de los tratamientos, con excepción de los tratamientos 1 y 2 de la matriz #2. La textura ideal del callo que se pretendía

lograr en estas matrices era aquella que fuese muy compacta y dura, con poca fenolización, las matrices #2, #3 y #4 cumplieron con este objetivo, pero en algunos tratamientos los callos presentaban texturas friables, que imposibilitaban pasar a una fase de organogénesis. De todas las matrices evaluadas, la #4 fue la que presentó mejores resultados para lograr un tipo de callo con características organogénicas (ver figura 5).

La figura 5, muestra la textura y coloración de los callos que se logró en la matriz 4 que contenía meta Topolina, los callos son compactos, nodulares y de coloración verdosa, un buen indicador para llegar a un proceso de organogénesis.

Figura 5. A, B y C Callos duros y compactos obtenidos en la matriz 4 para la formación de brotes.



1.5.2. Aislamiento protoplastos de *R. communis*

La metodología finalmente obtenida y estandarizada para la obtención de protoplastos a partir de mesófilo de *Ricinus communis* se resume en la figura 6. En esta figura se muestra como a partir de hojas de plantas *in vitro* de *R. communis*, se hacen cortes de manera transversal en tiras de 2 mm, posteriormente se dejan en la solución enzimática que contiene 1.6% de Celulasa Onozuka R-10 y 0.8% de Macerozima R-10, y se deja en agitación a 20°C, 50 rpm por 16 horas en oscuridad. Finalmente, la solución se filtra y se realizan centrifugaciones para hacer los respectivos lavados y colectar los protoplastos. La misma metodología se empleó para cada uno de los tratamientos evaluados con cada una de las variaciones a nivel de concentración de enzimas.



Figura 6. Metodología para obtención de protoplastos a partir de mesófilo de plantas de *Ricinus communis* haciendo uso de las enzimas Celulasa R-10 y Macerozima R-10.

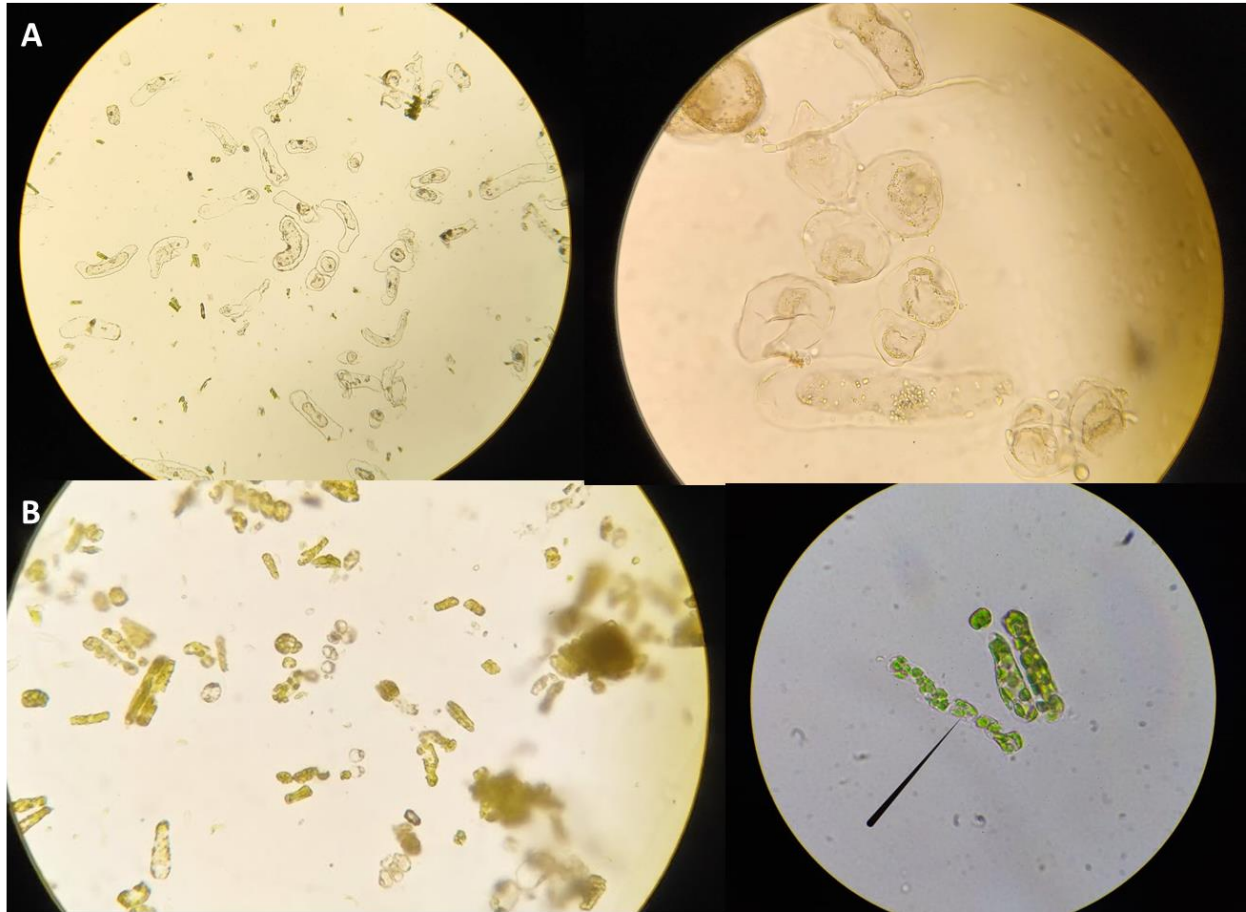
Tras evaluar cada uno de los tratamientos y medir las variables de respuesta de número de protoplastos por mililitro de solución y viabilidad de las células obtenidas, se obtuvo los siguientes resultados.

El tratamiento #4, que contenía 1.6% de Celulasa y 0.8% de Macerozima, con 16 horas de incubación, fue la mejor condición para lograr un alto contenido de protoplastos (144.35×10^4 protoplastos/ml) con un alto porcentaje de viabilidad (95%) (Ver Tabla 9). Por otro lado, para este mismo tratamiento, pero con 14 horas de incubación, se logró un mayor porcentaje de viabilidad (96%) pero con menor concentración de protoplastos (84.75×10^4). El tratamiento #3 que contenía 1.5% de Celulasa *Aspergillus niger* y 0.4% de Peptinase *Rhizopus sp* con 8 horas de incubación fue el que menor concentración de protoplastos/ml arrojó (0.63×10^4) con una viabilidad del 89%. De igual forma, en esta investigación se evaluaron tratamientos enzimáticos para obtener protoplastos a partir de tejido de callos, pruebas que resultaron no exitosas, tal como lo muestra la figura 2, que también muestra las células obtenidas con los tratamientos 1, 2 y 3. Para este caso, las células que se obtuvieron después del proceso enzimático en tejido de callo son alargadas y parenquimatosas, lo que no coincide con lo reportado por (Tudses, Premjet, and Premjet 2014), en donde los protoplastos obtenidos a partir de callos son incoloros, de forma esférica y más grandes que los de mesófilo (Ver figura 7a).

Tabla 9. Mezcla enzimática de fitohormonas y tiempos de incubación evaluadas para el aislamiento de protoplastos a partir de mesófilo.

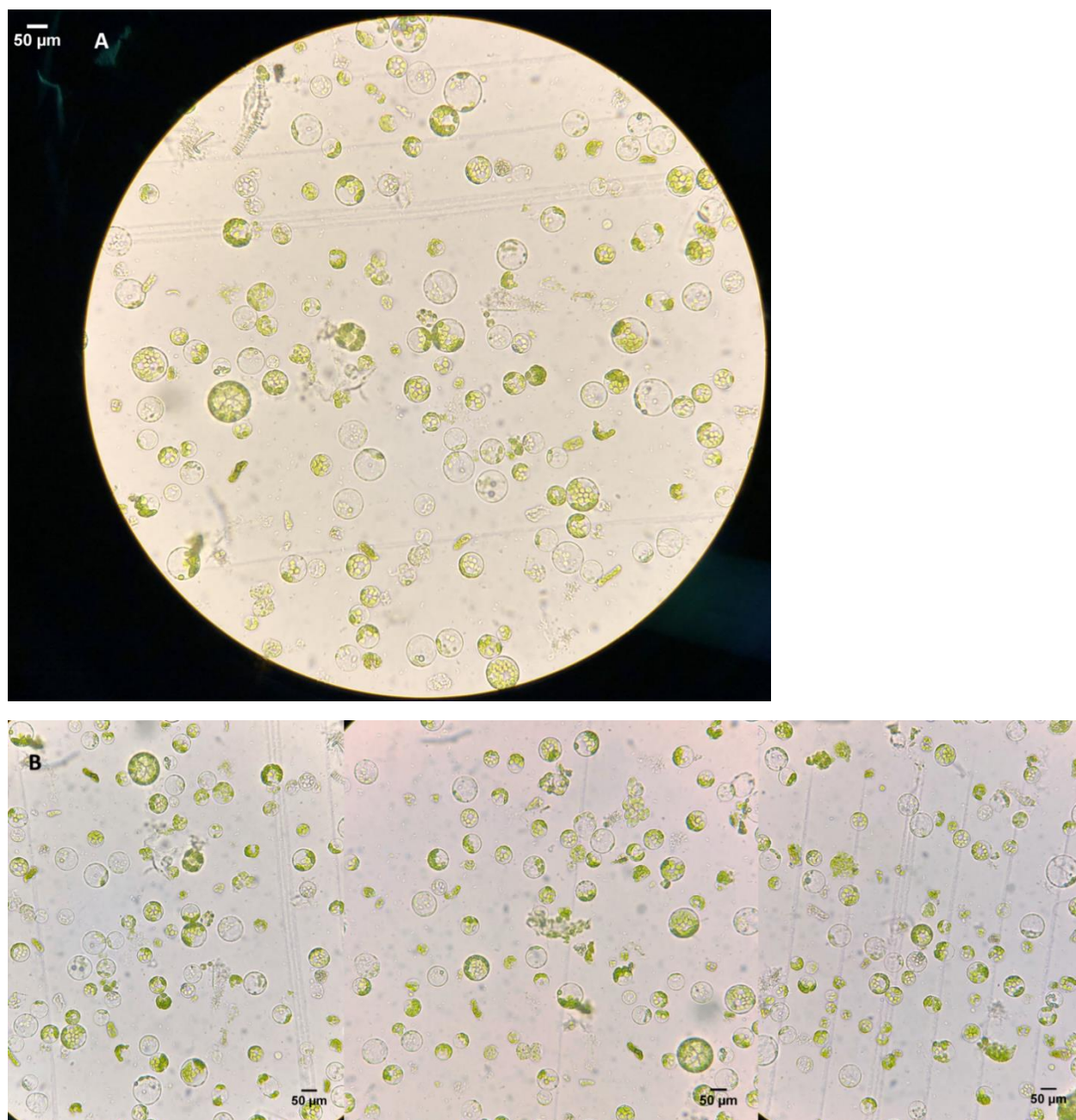
Tratamiento	Tiempo de incubación (horas)	Número de protoplastos por ml	Viabilidad(%)
T1	8	0.73×10^4	88%
	10	7.65×10^4	86.2%
	12	11.4×10^4	84.7%
	14	13.3×10^4	74%
	16	19.5×10^4	71%
	18	33.5×10^4	56%
T2	8	0.82×10^4	87.6%
	10	9.4×10^4	84.2%
	12	15.7×10^4	83.7%
	14	18.7×10^4	75%
	16	22.5×10^4	60%
	18	38×10^4	58%
T3	8	0.63×10^4	89%
	10	3.6×10^4	87.4%
	12	8.7×10^4	87%
	14	9.2×10^4	83%
	16	9.8×10^4	81.6%
	18	10.3×10^4	81.2%
T4	14	84.75×10^4	96%
	16	144.35×10^4	95%
	18	93.43×10^4	80%

Figura 7. A. Visualización de células de callos de *R. communis* aisladas mediante digestión enzimática. 40x. B. Células de mesófilo de *R. communis* de los tratamientos enzimáticos 1, 2 y 3. 40x.



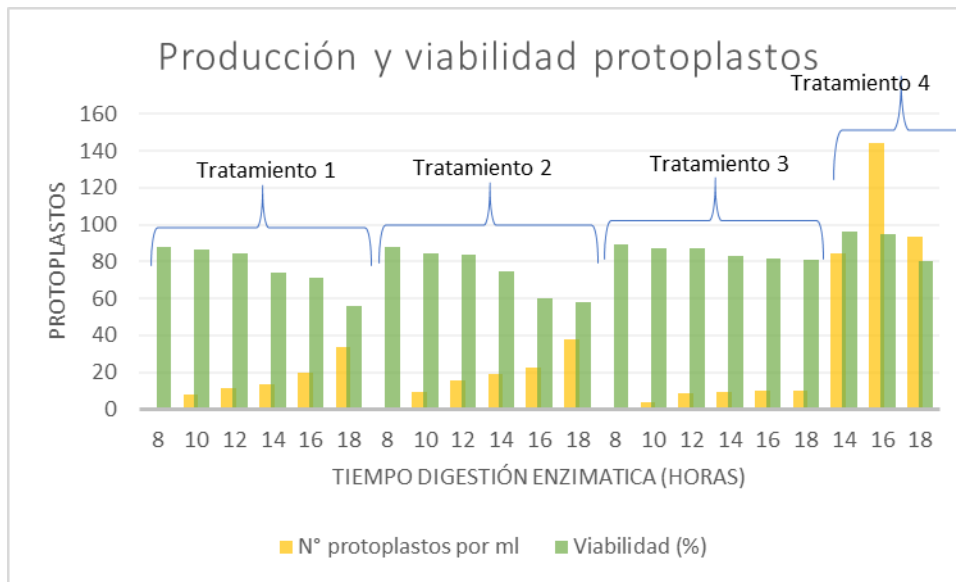
Caso contrario es la figura 8, que muestra las células obtenidas con el tratamiento 4 (ver tabla 4) que según la figura 9, muestra que fue el mejor tratamiento, puesto que se observó células individualizadas, de forma esférica, de color verde y con un aspecto turgente, con un tamaño entre 30 y 50 μm (Tudses, Premjet, and Premjet 2014).

Figura 8. A y B. Células de mesófilo de *R. communis* obtenidas del tratamiento enzimático 4 (1.6% de Celulasa y 0.8% de Macerozima, con 16 horas de incubación a 29°C, ver tabla 1)
Objetivo 40x



La figura 9 muestra la obtención de protoplastos por ml en cada uno de los tratamientos enunciados en la tabla 4 (barras amarillas), así mismo, se contrasta esta obtención de protoplastos con la viabilidad (%) (barras verdes) durante las horas de digestión con las concentraciones enzimáticas. Se evidencia una vez más que el mejor tratamiento para obtener una mayor producción de protoplastos con un buen porcentaje de viabilidad se encuentra en el tratamiento #4 con 1.6% de Celulasa y 0.8% de Macerozima, con 16 horas de incubación

Figura 9. Gráfica de obtención y viabilidad de los protoplastos obtenidos a partir de mesófilo de *R. communis*.

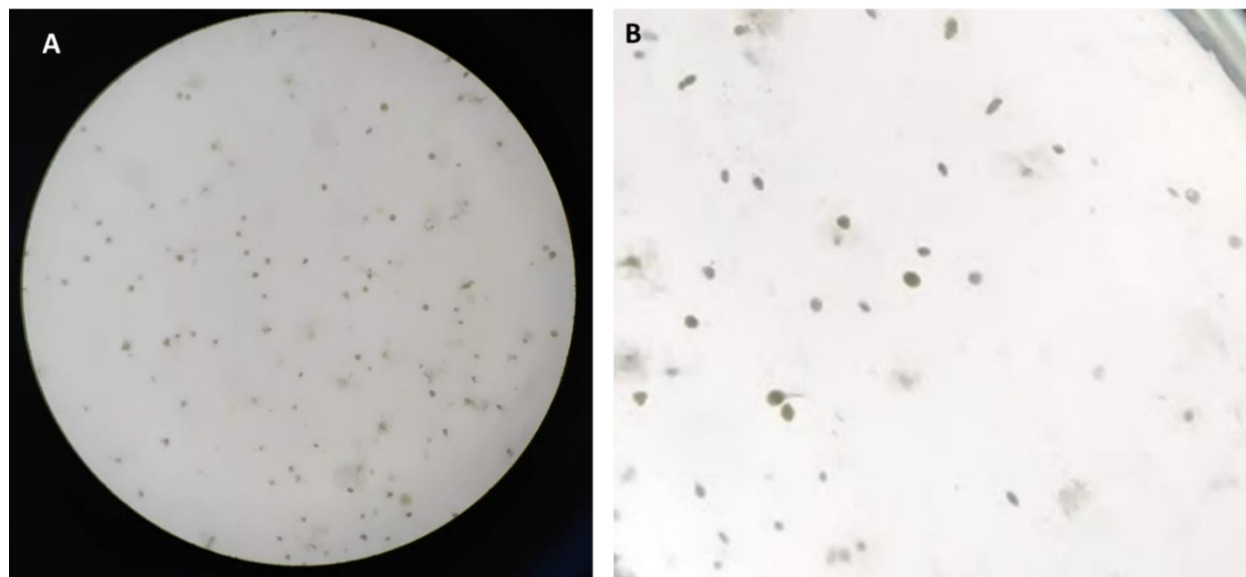


1.5.2.1. Cultivo de protoplastos de *R. communis*

Después de aislar los protoplastos, siguiendo las condiciones establecidas en el tratamiento 4 (elegido el tratamiento ideal), se procedió a cultivarlos protoplastos en medio líquido para formación de callos y para posteriormente ser transferidos a la matriz correspondiente para la formación de microcallos y así, obtener callos embriogénicos (ver figura 10)

Durante el proceso de cultivo de los protoplastos, se evidenció alta contaminación del medio por crecimiento bacteriano y algunos casos por hongos, probablemente por la alta humedad que albergaban las cajas Petri que contenían los protoplastos en cultivo, sin embargo, se obtuvieron formación de pequeños callos que nos permitieron conectarlos con la metodología de la sección 1.4.3.

Figura 10. A y B. Pequeñas colonias de microcallos de *Ricinus communis* formados a partir de protoplastos de mesófilo.



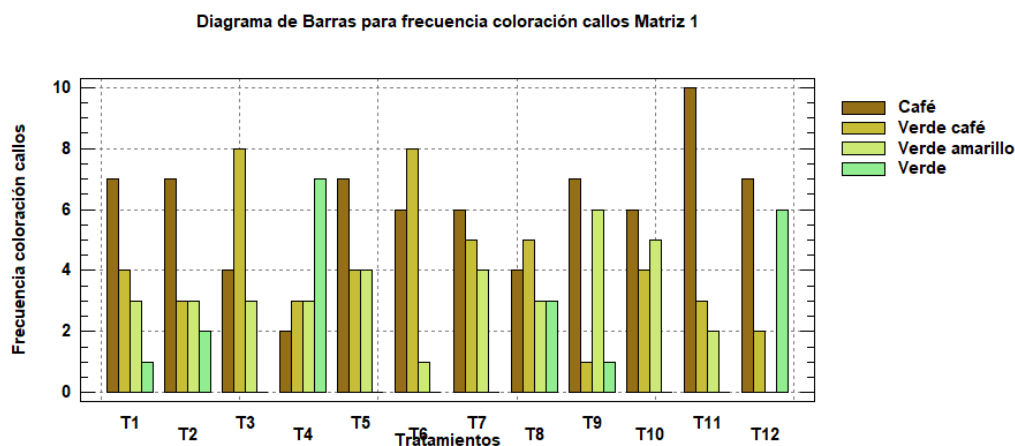
1.5.3. Análisis estadístico de las matrices para organogénesis callos de Higuierilla y para obtención de protoplastos.

1.5.3.1. Análisis estadístico de matrices organogénesis callos *R. communis*

Después de la recolección de datos proveniente de cada una de las matrices para la organogénesis de callos de Higuierilla, se sometieron al análisis estadístico enunciado en la metodología. Los datos se procesaron en el software Statgraphics Centurion XVIII.

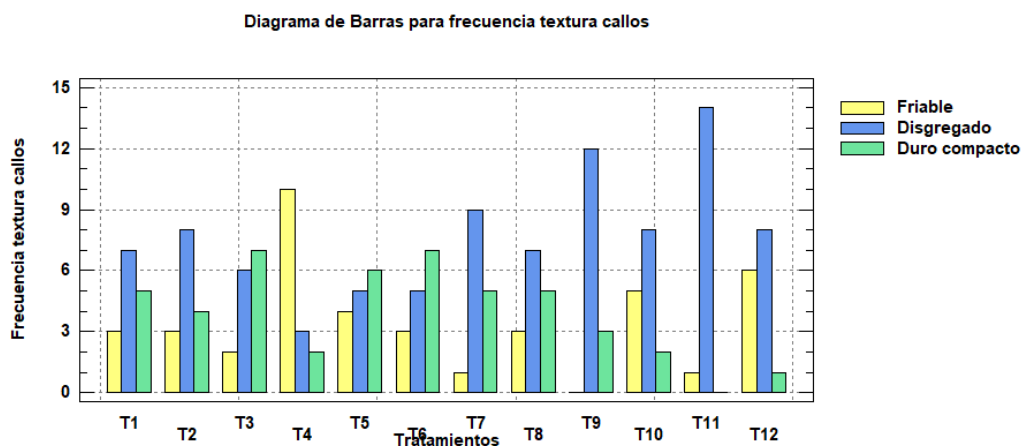
a. Análisis estadístico matriz 1.

Figura 11. Gráfica de diagrama de frecuencia para la coloración de la matriz 1.



La Figura 11 representa el análisis de datos categóricos evaluados mediante tablas de contingencia, el análisis de independencia realizado por el test de Chi cuadrado con un nivel de confianza del 95% (valor P: 0.0003) (n=180). Se evidencia que el tratamiento 4 presenta mayor frecuencia de callos con color café, mientras que el tratamiento 11 tiene presente la mayor frecuencia de callos con color café, lo que podría indicar mayores frecuencias de fenolización.

Figura 12. Gráfica de diagrama de frecuencia para la textura de la matriz 1.



La gráfica de la figura 12 representa el análisis de datos categóricos evaluados mediante tablas de contingencia, el análisis de independencia realizado por el test de Chi cuadrado con un nivel de confianza del 95% (valor P: 0.0004) (n=180)

Para las tablas de contingencia realizadas para la primera matriz con sus variables de respuesta categóricas, se puede observar que para ambos casos el valor P de la prueba de Chi cuadrado es menor que el valor α de 0.05, lo que indica que se rechaza la hipótesis nula que asegura independencia entre las variables y se acepta el hecho de que existe una asociación entre el tratamiento con la respuesta obtenida, con un nivel de confianza del 95%

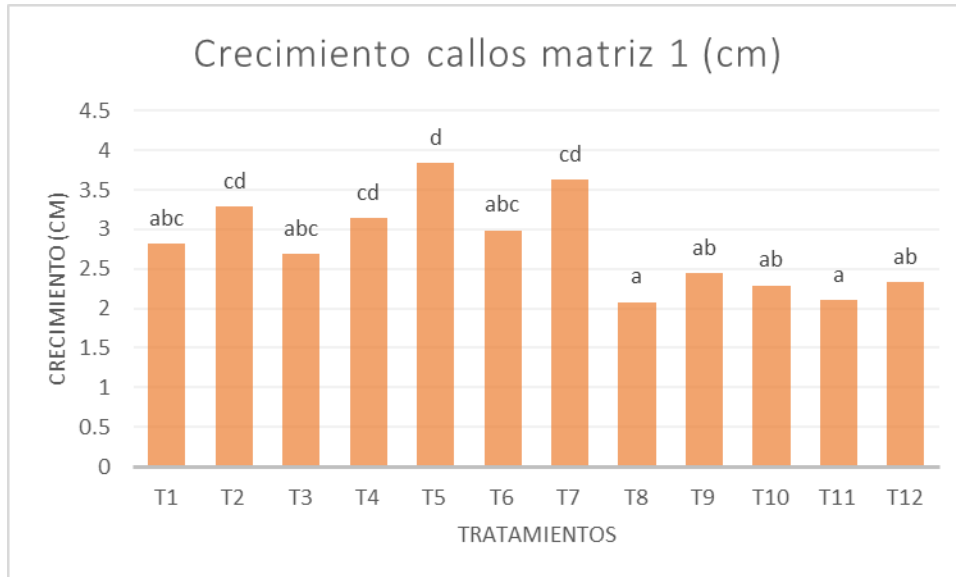
Las figuras 13 y 14 representan los resultados de las pruebas de rangos múltiples con el test LSD para las variables de respuesta de peso y crecimiento, respectivamente, para identificar cuales medias son significativamente diferentes de otras en cada uno de los tratamientos. Para el caso del peso de los callos de la matriz #1, se identifican 4 grupos homogéneos según las letras en la parte superior de las columnas, y en la figura 14, que corresponde al crecimiento de los callos se identifican 5 grupos homogéneo. No existen diferencias estadísticamente significativas en las medias de aquellos tratamientos que comparten la misma letra.

Figura 13. Gráfica para la media del peso en gramos para cada uno de los tratamientos de la matriz 1. (Presentados en la tabla 8)



Los valores asociados a letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Figura 14. Gráfica para la media del crecimiento en centímetros de los callos en cada uno de los tratamientos de la matriz 1 (presentados en la tabla 8)



Los valores asociados a letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

b. Análisis estadístico matriz 2

Las gráficas de las figuras 15 y 16 representan el análisis de datos categoricos evaluados mediante tablas de contingencia, el analisis de independencia realizado por el test de Chi cuadrado con un nivel de confianza del 95% (N=50).

Para las tablas de contingencia realizadas para la segunda matriz con sus variables de respuesta categóricas, se puede observar que para ambos casos el valor P de la prueba de Chi cuadrado es mayor que el valor α de 0.05, 0.1633 y 0.0765 para coloración y textura respectivamente, lo que indica que se acepta la hipotesis nula que asegura independencia entre las variables con un nivel de confianza del 95%, lo anterior indica que las variables de respuesta observadas pueden ser independientes a los tratamientos aplicados, por lo tanto, las observaciones en la coloración y textura al de los callos sometidos a esta matriz puede ser gracias a las concentraciones de fitohormonas evaluadas o a cualquier factor externo no contemplado.

Figura 15. Gráfica de diagrama de frecuencia para la textura de la matriz 2.

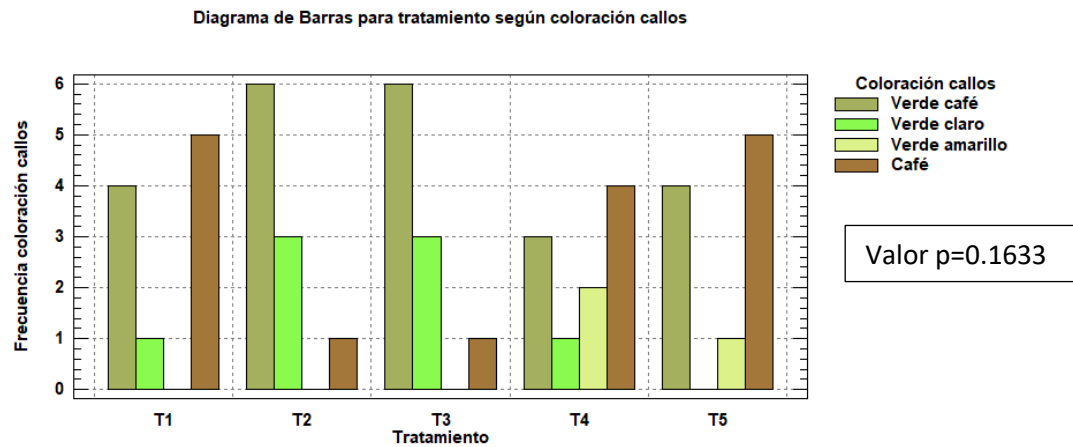
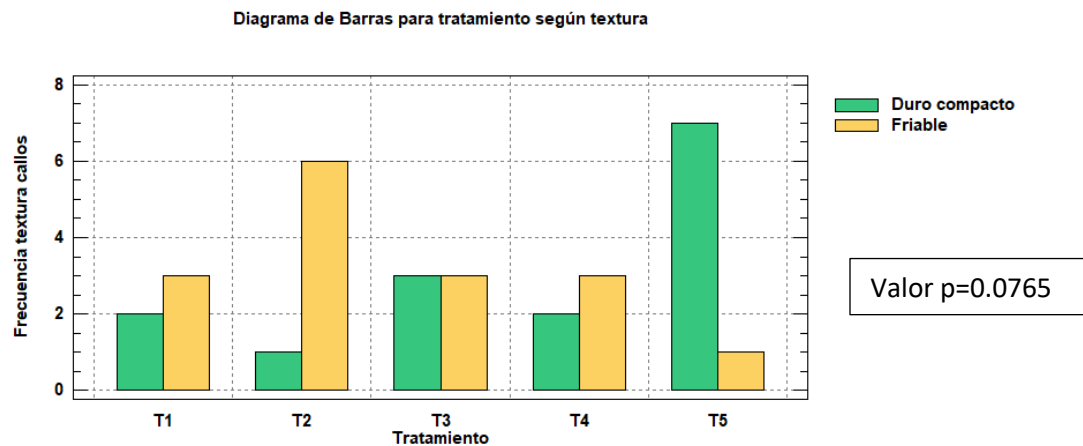


Figura 16. Gráfica de diagrama de frecuencia para la textura de la matriz 2.



c. Análisis estadístico matriz 3

La gráficas de las figuras 17 y 18, representan el analisis de datos categoricos evaluados mediante tablas de contingencia, el analisis de independencia realizado por el test de Chi cuadrado con un nivel de confianza del 95% (N=50)

Las tablas de contingencia realizadas para matriz 3 con sus variables de respuesta categóricas, se puede observar que para ambos casos el valor P de la prueba de Chi cuadrado es mayor que el valor α de 0.05, 0.4307 y 0.5039 para coloración y textura de los callos respectivamente, lo que indica que bajo un nivel de confianza del 95%, las variables de respuesta observadas pueden ser independientes a los tratamientos hormonales aplicados. Al igual que en la matriz #2, se

obtuvieron valores P mayores al α , explica el mismo fenómeno de que las características de coloración y textura de los callos sometidos a las concentraciones de fitohormonas de la matriz #3 puede ser gracias a éstas o a algún factor externo que este influyendo en los cambios de estos parámetros.

Figura 17. Gráfica de diagrama de frecuencia para la textura de la matriz 3.

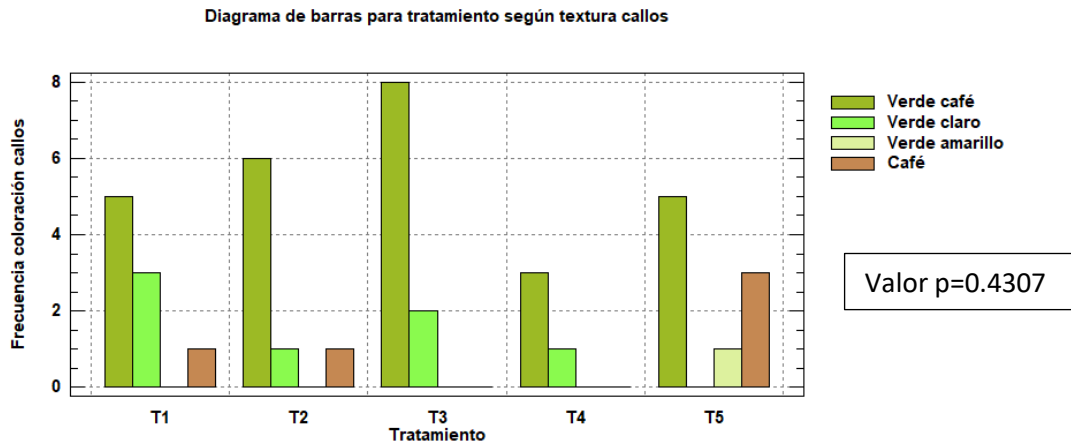
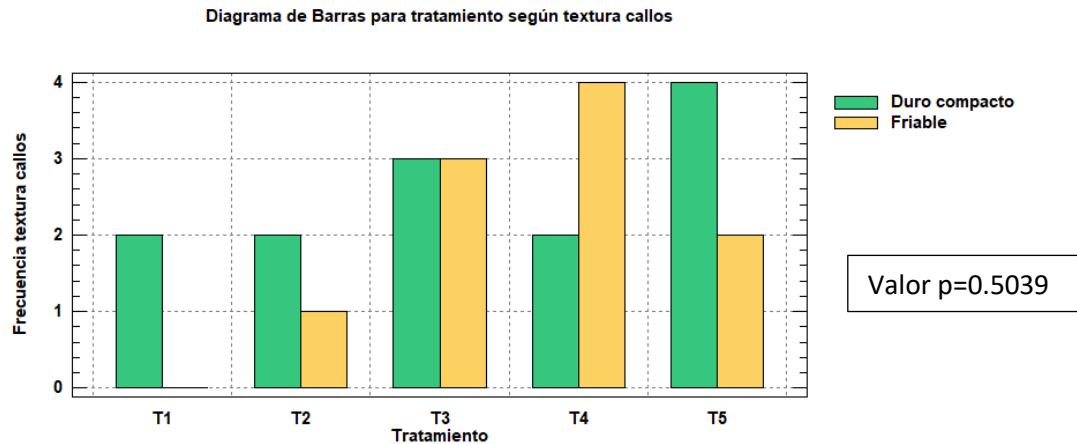


Figura 18. Gráfica de diagrama de frecuencia para la textura de la matriz 3.



d. Análisis estadístico matriz 4

La gráficas para las figuras 19 y 20, representan el analisis de datos categoricos evaluados mediante tablas de contingencia, el analisis de independencia realizado por el test de Chi cuadrado con un nivel de confianza del 95% (N=150)

Las tablas de contingencia para la matriz 4, nos presentan que los valores P son menores al valor α de 0.05, lo cual nos indica que los tratamientos hormonales aplicados a los callos tienen un efecto asociado a las variables respuesta de coloración y textura bajo un 95% de probabilidad. En la matriz #4, encontramos un comportamiento diferente a las matrices #2 y #3, puesto que al obtener valores P menores al α , estamos asegurando con un 95% de confianza que los diferentes tratamientos de esta matriz están influyendo en el cambio de coloración y textura de cada uno de los callos.

Figura 19. Gráfica de diagrama de frecuencia para la textura de la matriz 4.

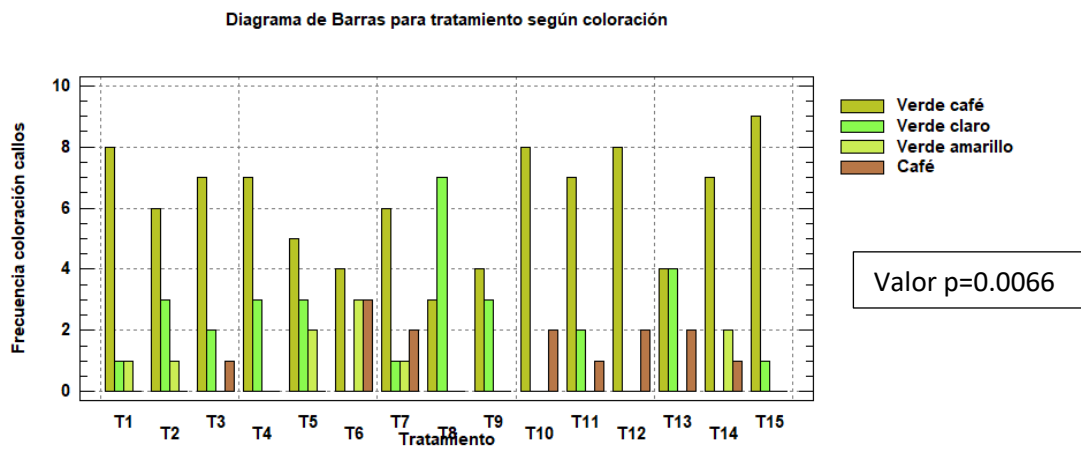
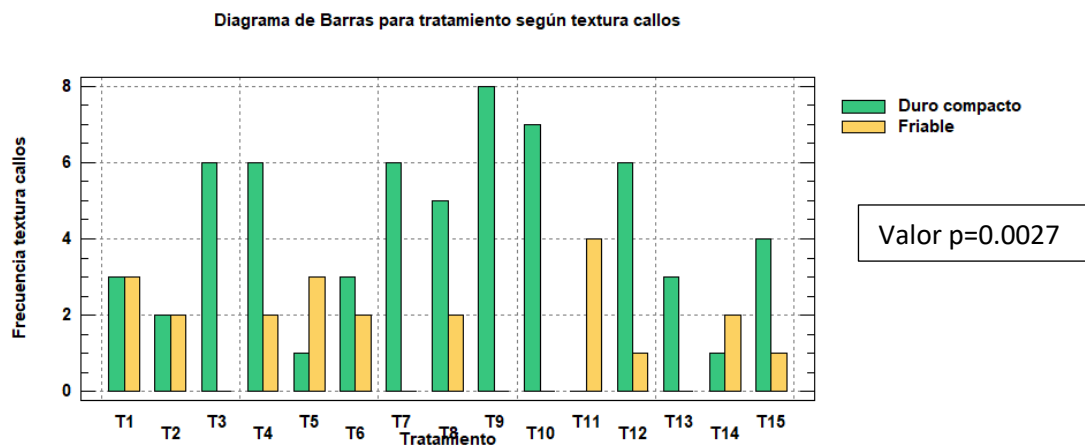


Figura 20. Gráfica de diagrama de frecuencia para la textura de la matriz 4.

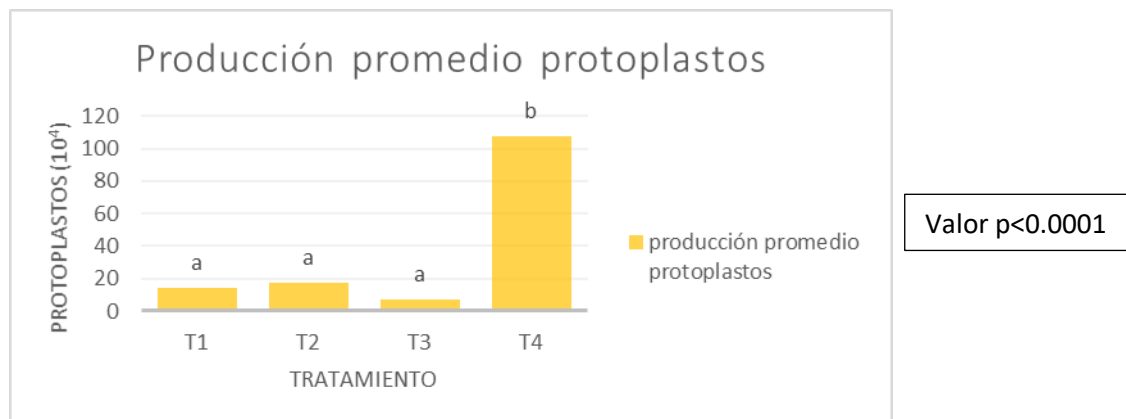


1.5.3.2. Análisis estadístico para obtención de protoplastos

Posteriormente, se analizó los datos de las variables de respuesta para la obtención de protoplastos, procesando los datos de manera estadística por medio de un análisis de varianza (ANOVA-one way) con un nivel de confianza del 95% y la diferencia entre las medias de los tratamientos fue estimada con el análisis de rangos múltiples LSD usando el software Statgraphics Centurion XVIII.

La figura 21 representa los resultados obtenidos luego de realizar el análisis LSD, aquí se muestra que la media para una mayor obtención de protoplastos por ml fue mayor para el tratamiento 4. Los tratamientos 1, 2 y 3 tienen media de producción de protoplastos similares y difieren del tratamiento 4 con un nivel de confianza del 95%

Figura 21. Gráfica de media de producción de protoplastos obtenidos a partir de mesófilo de *R. communis*.



Los valores asociados con letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

1.6. Discusión

1.6.1. Efecto de diferentes combinaciones hormonales sobre la inducción y multiplicación de callo a partir de mesófilo de *R. communis*.

En la etapa de inducción de callos los tratamientos evaluados, algunos callos se tornaron oscuros en la superficie en contacto con el medio de cultivo, después de 20 días de cultivo (figura 3F). Este pardeamiento, según Sánchez y Salaverría (2004), posiblemente se deba a la biosíntesis de compuestos fenólicos y esto pudo haberse aumentado por la demora en el proceso de replicación (exposición en nuevos medios de cultivo), así como por la exposición de los callos a temperaturas mayores de 25°C o por una concentración elevada de los reguladores de crecimiento. Generalmente

luego de ocurrir el ennegrecimiento del tejido se produce la necrosis del explante. Es por esta razón que se decidió que los subcultivos fueran cada 15 días para reducir la fenolización de los explantes.

El color de los callos en oscuridad al principio tenía una tonalidad blanquecina, sin embargo, después de los subcultivos se fue tornando el callo de un color café claro. En el tratamiento sin hormonas (control), las hojas respondieron inicialmente de igual manera que las hojas en presencia de hormonas, las hojas sufrieron un encorvamiento, lo cual es característico de las hojas expuestas a reguladores de crecimiento y esto se debe posiblemente a la concentración de hormonas (auxinas y citoquininas) endógenas (Roca W.M & Mroginski L.A, 1991). En contraste con los otros tratamientos, en el control no hubo formación de callo.

Los explantes en el tratamiento 8 no formaron callo o formaron muy poco, esto indica que la alta concentración de las hormonas utilizadas no favorece el proceso de dediferenciación, por el contrario, produce la necrosis del explante después de transcurrido 45 días de cultivo (figura 3D). Posiblemente para la variedad de higuera evaluada esta alta concentración de diferentes citoquininas combinadas puede ser tóxico.

1.6.2. Inducción de brotes a partir de callos de *R. communis*.

En este trabajo se evaluaron varios tipos de concentraciones de citoquinina por su capacidad de inducir brotes a partir de callo, evaluando también la meta-topolina (*mT*), una citoquinina originalmente aislada de las hojas de la planta *Populus x robusta* (Horgan et al. 1975). Esta hormona ha sido reportada recientemente por ser efectiva para la regeneración tanto directa como indirecta en diferentes especies (Vijayakumar et al. 2017; Chauhan and Taylor 2018; Solórzano-Cascante, Sánchez-Chiang, and Jiménez 2018).

En este trabajo, durante la evaluación de los diferentes tratamientos para formación de callo organogénico, se identificaron diferentes colores y texturas en los callos (Figura 4 y 5) (Tabla 7 y 8), sin embargo, solo los callos verdes con consistencia dura y compacta se obtuvo en pocos tratamientos (3, 5 y 6) (Tabla 8). Para el caso de las tres matrices para la formación de brotes por organogénesis indirecta, los tratamientos más prometedores que conservaban un callo compacto y nodular fueron los de la matriz 4 (tabla 8) (Figura 5). Aunque en esta investigación los callos obtenidos fueron similares a lo reportado por Kumari et al, 2008, este tipo de callo no regeneró brotes (Figura 5). Esto se debe principalmente a la recalcitrancia de esta especie como se ha reportado en varios artículos, por lo tanto, diferentes técnicas del cultivo *in vitro* son poco exitosos y reproducibles.

Los diferentes resultados de tratamientos para la formación de callo organogénico se sometieron a análisis estadísticos para cada una de las matrices. Para la matriz 1, que corresponde a la generación de callos compactos, existe una relación directa entre los tratamientos hormonales y las variables respuesta ya que los valores $p \leq 0.05$, para el caso del peso de los callos, los tratamientos 8, 10, 11 y 12 pertenecen a un mismo grupo y son los que junto al tratamiento 9, presentan menor peso. En la variable de crecimiento ocurre el mismo panorama que en el peso, porque los tratamientos 8, 9,

10, 11 y 12 presentan los valores más inferiores. Al momento de analizar los datos para las matrices de formación de callos organogénicos, es de particular interés que las matrices 2 y 3 presentaron valores $p > 0.05$ para la prueba de Chi cuadrado, lo que nos estaría indicando que posiblemente el efecto de las hormonas utilizadas (TDZ, ANA, BAP) para estos tratamientos no tengan un efecto directo en el cambio de coloración y textura de los callos. Caso contrario se observa en la matriz 4, donde se presentan valores $p < 0.05$, y nos indica que en efecto las diferentes concentraciones de hormonas en los tratamientos si parecieran tener un efecto en la variable respuesta de coloración y textura, aquí lo importante es resaltar que la hormona que difiere a las otras dos matrices anteriores es la *mT*, que se ha reportado como exitosa para el caso de la yuca (Chauhan and Taylor 2018) pero poco en otras Euphorbiaceae (Amoo, Finnie, and van Staden 2011; Baghel and Bansal 2015; Aremu et al. 2012). Resulta de gran interés el uso de esta citoquinina en cultivo *in vitro* de *Ricinus communis* para adelantar estudios a nivel de regeneración y formación de brotes.

1.6.3. Aislamiento de protoplastos

En el aislamiento de protoplastos el tiempo de digestión y el osmótico puede afectar el rendimiento y la viabilidad, en algunos casos, los protoplastos aislados pueden perder la capacidad de regenerar la pared y dividirse. Por lo tanto, se debe buscar la concentración y la enzima lítica adecuada para degradar la pared celular, así como mantener la presión osmótica para obtener protoplastos viables (Mroginski and Roca 1991)

El tipo y estado fisiológico de la fuente de protoplastos son factores críticos que pueden influir de sobremanera en el éxito del procedimiento de aislamiento y cultivo de protoplastos. Para el aislamiento, es necesario utilizar células de tejidos en crecimiento activo, además dejar el tejido vegetal en oscuridad permite menor fijación de carbono en la pared celular y reduce la cantidad de almidón, el cual hace difícil el ajuste osmótico. El material vegetal más reportado para el aislamiento de protoplastos ha sido mesófilo. Éste se ha reportado en especies como *Arabidopsis thaliana* (Yoo, Cho, and Sheen 2007), *Cucumis sativus* (Huang et al., 2013), *Zea Mays* (Chen et al. 2015), *Prunus avium* (Yao et al. 2016), *Glycine max* (Amin et al. 2018). Para la familia Euphorbiaceae, los mayores reportes han sido para yuca (*Manihot esculenta*) (Wu et al. 2017), *Euphorbia pulcherrima* (Pitzschke and Persak 2012) y *Jatropha curcas* (Tudses, Premjet, and Premjet 2015). Para nuestro objetivo de lograr aislar protoplastos de *Ricinus communis*, las hojas y callos fueron usados como explantes iniciales (Tudses et al, 2014;), por ser un protocolo que se han reportado para otras especies como fáciles y replicables.

En esta investigación, se usó una solución plasmolizante reportada por (Wu et al. 2017), con el objeto de ayudar a recoger el citoplasma y así evitar que el protoplasto se dañe (Pierik 1990). La concentración reportada por Wu et al. (2017) fue la adecuada para esta variedad, por consiguiente, aunque se cambió la concentración de enzimas y tiempo de incubación, se continuó con la solución plasmolizante en todos los ensayos.

La duración adecuada para aislar protoplastos depende de la complejidad de la pared celular, la composición enzimática y la temperatura de incubación, que por lo general es de 25-30°C (Tudses et al, 2014; Tang et al, 2019). Los resultados de este trabajo concuerdan con los obtenidos por Tudses et al, 2014, los cuales realizaron aislamiento de protoplastos en las especies de *Jatropha curcas* y *Ricinus communis* a partir de soluciones con diferentes concentraciones enzimáticas y en diferentes tiempos de incubación; puesto que en cuanto a todos los tratamientos evaluados se encontró que, a mayor tiempo de incubación se presentaba un alto porcentaje de células dañadas, al parecer las enzimas degradaron tanto las proteínas de la pared celular como las proteínas de la membrana celular (Tabla 9). Por el contrario, en todos los tratamientos a menor tiempo de incubación se encontró un número de protoplastos bajo y es coherente con lo reportado por Tudses et al, 2014 y Ying et al, 2019 (Tabla 9), esto se debe a que las hojas de higuierilla tienen una cutícula y paredes gruesas, que en parte podría haber obstaculizado el proceso de la digestión de la pared celular (Borgato *et al.*, 2007).

Las células encontradas en el aislamiento de los protoplastos eran la mayoría de las células parenquimatosas, las cuales se caracterizan por ser mucho más grandes que las células meristemáticas y con paredes primarias delgadas (Fehér 2019). En general los protoplastos a partir de hojas eran esféricos, ricos en cloroplastos y de color verde (Figura 8). También se observó que algunas células no eran completamente redondas (Figura 7), esto probablemente debido a que las enzimas no degradaron completamente la pared celular.

La composición de la solución enzimática tuvo un efecto significativo en la cantidad de protoplastos obtenidos y la viabilidad (Tabla 9, figura 9). El tratamiento que consiguió el mayor número de protoplastos fue el tratamiento 4 (figura 4) que tiene una concentración enzimática de 1.6% de Cellulase "Onozuka" R-10 y 0.8% de Macerozyme R-10 con 16 horas de incubación, obteniendo 144.35×10^4 protoplastos/ml y con una viabilidad de 95%. Estos resultados demuestran una mayor cantidad de protoplastos obtenidos por gramo de tejido fresco de hoja en *R. communis*, al ser comparados con las investigaciones de Tudses et al, 2014 y Tang et al, 2019, los cuales reportaron concentraciones de protoplastos de 8.5×10^5 y 1.19×10^6 , respectivamente, con menor tiempo de incubación (11h y 1.3h respectivamente) en la variedad evaluada, demostrando que la respuesta es genotipo dependiente.

Aunque los tiempos de incubación para producir protoplastos en Euforbiáceas es muy variable (1h-18h) (Nishimura and Beevers n.d.; Y. Liu et al. 2019). En esta investigación se encontró que el tiempo ideal de incubación con las enzimas obtenido se encuentra en el rango promedio que se ha reportado en los artículos, en los cuales afirman que el tiempo para completar la liberación de los protoplastos varía entre 11 y 18 horas, dependiendo de la variedad evaluada (Tudses et al, 2014; Chandran and Sujatha, 1996).

De otro lado, como material inicial para el aislamiento de protoplastos a partir de callos friables, se utilizaron los callos que se encontraban en la fase exponencial de crecimiento, es decir 15 días

después de subcultivados, ya que éstas tienen generalmente paredes más finas (Pierik 1990). No obstante, no se obtuvo protoplastos en ninguno de los tratamientos evaluados (figura 7, a).

Aunque la adición de hemicelulasa no es muy común en el momento de aislar protoplastos a partir de callos, debido a que la celulasa hace la función de ésta, en algunos ensayos para el aislamiento de protoplastos se empleó la hemicelulasa para que tuviera un efecto más pronunciado sobre la pared de las células, pero igualmente no se logró obtener protoplastos. Una posible explicación a este resultado poco exitoso es que la sinergia entre la celulasa de *Aspergillus niger* no fue lo suficientemente efectiva la hora de degradar la pared primaria de la pared celular de la célula y por este motivo, la hemicelulosa no logró degradar la hemicelulasa que se encontraba en dicha pared, lo que no generó protoplastos sino células con bajo porcentaje de degradación en su pared celular. Las células de los callos son heterogéneas y pueden estar compuestas de agregados de diferentes tamaños, lo que lleva a que no todas las células están en condiciones óptimas para la liberación de protoplastos (Mroginski and Roca 1991). En nuestro caso, aunque el aislamiento de los protoplastos a partir de callos se evaluó principalmente durante la fase de crecimiento (donde las células predominantes se encuentran en crecimiento y son las meristemáticas), al ser células que están en continua división presentan paredes más delgadas, siendo teóricamente más fácil el aislamiento de los protoplastos. Así mismo, son células que tienen la ventaja de poseer bajo contenido de almidón y, aun así, no se logró el aislamiento en ninguno de ellos. Es posible que una mejor respuesta de aislamiento de protoplasto se hubiera obtenido al hacerse en otro tiempo de crecimiento celular. Sin embargo, tiempos de subcultivo mayores a 15 días tienden a formar agregados con pocas células sueltas, lo que dificulta la acción correcta de las enzimas sobre las paredes celulares de cada célula para la liberación del protoplasto (Figura 7).

Aunque se utilizó una concentración similar (2% cellulase onozuka R10 y 2% Pectinasa) a la reportada por (Tudses, Premjet, and Premjet 2014) para la obtención de protoplastos a partir de callo, en esta investigación no se obtuvo un resultado favorable para el aislamiento de los mismos, y aunque se aumentó gradualmente la concentración de las enzimas (e inclusive se adicionó la hemicelulasa), no se obtuvo resultados favorables en el aislamiento. Por el contrario, la viabilidad de las células iba disminuyendo cada vez que aumentaba la concentración de enzimas, factor atribuido al daño que las enzimas pudieron causar a una parte de la pared celular y en el mismo sitio se fue dañando la membrana celular, generando espacios que permitieron el ingreso del colorante usado en la evaluación de la viabilidad de los protoplastos, pues las células se tiñeron indicando esto la muerte celular. Sin embargo, la concentración del estabilizador osmótico propuesto fue el adecuado para que las células fueran plasmolizadas.

1.6.3.1.Cultivo de protoplastos

El aislamiento y cultivo de protoplastos tiene un requerimiento específico para cada especie y cada tipo de tejido. En este trabajo el cultivo fue solo posible para los protoplastos aislados a partir de

mesófilo. Aunque se tuvieron todas las precauciones para prevenir la contaminación, al ser un procedimiento que se involucran muchos pasos es frecuente la alta contaminación celular en alguna etapa u otra.

El éxito de un sistema de cultivo de protoplastos principalmente consiste con producciones consistentes de una gran población de protoplastos uniformes y de un gran número de protoplastos con alta viabilidad (Borgato, Pisani, and Furini 2007). En nuestro caso se obtuvo una alta cantidad de protoplastos viables (Tabla 9), sin embargo, fueron pocas las colonias que se lograron desarrollar (Figura 10), seguramente esto se deba a que los protoplastos recién aislados requieren una estabilización osmótica que se logra mediante la adición de altas concentraciones de glucosa o manitol y aunque en nuestro caso se adicionó una alta concentración de glucosa (60g/L) posiblemente no fue la concentración adecuada para la regeneración de los protoplastos y su división celular para la formación de callos.

La capacidad para producir un organismo altamente diferenciado, a partir de una sola célula somática, es una característica única de los protoplastos de las plantas superiores (Roca W.M & Mroginiski L.A, 1991). Sin embargo, varios parámetros, particularmente el tejido, el medio de cultivo y factores ambientales, influyen en la capacidad de los protoplastos y las células derivadas de protoplastos para expresar su totipotencia y desarrollar plantas. Debido a que la higuera es recalcitrante, los reportes sobre aislamiento de protoplastos (Liu et al, 2019; Chandran y Sujatha, 1996; Tuds et al, 2014) solo son exitosos hasta la formación de callos, sin lograr obtener plantas a partir de ellos, como en nuestro caso.

1.7. Conclusiones

En esta investigación se obtuvo un protocolo simple y que puede replicarse en el aislamiento de protoplastos a partir de hojas de *R. communis*, protocolo que resultó ser limitado para el aislamiento de protoplastos a partir de callos en la variedad evaluada. A pesar de que los protoplastos proporcionan un sistema básico para la investigación fisiológica y genética y que se ha tenido un gran progreso con esta técnica, hay muchos desafíos incluyendo la recalcitrancia de algunos sistemas de protoplastos para expresar su totipotencia. En esta investigación la combinación y la concentración de las enzimas tuvo un efecto significativo en el aislamiento de protoplastos. También se encontró que entre mayor el tiempo de incubación mayor es el número de protoplastos obtenidos. Sin embargo, si el tiempo de incubación se prolongaba la cantidad de protoplastos viables descendía.

Para el caso de regeneración de protoplastos de *R. communis* en plántulas, lo que corresponde al objetivo principal, solo se logró llegar hasta la formación de callos nodulares organogénicos, pero no se observó ninguna formación de brotes, aunque la incorporación de la citoquinina metatopolina no se ha visto reportada en estudios de formación de brotes a partir de callos de *R. communis* resulta bastante interesante adelantar más estudios en combinación con otras

fitohormonas para lograr una formación de plántulas desde protoplastos en la especie de *Ricinus communis*.

1.8. Referencias

- A. Sarvesh, D.M. Ram Rao, T.P. Reddy. 1992. "Callus Initiation and Plantlet Regeneration from Epicotyl and Cotyledonary Explants of Castor (*Ricinus Communis* L.)." *Adv. Plant Sci.* 5: 124–28.
- Agari, Yoshihiro, Seiki Kuramitsu, and Akeo Shinkai. 2010. "Identification of Novel Genes Regulated by the Oxidative Stress-Responsive Transcriptional Activator SdrP in *Thermus Thermophilus* HB8." *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02133.x>.
- Ahn, Yeh-Jin, Louisa Vang, Thomas A McKeon, and Grace Q Chen. 2007. "High-Frequency Plant Regeneration through Adventitious Shoot Formation in Castor (*Ricinus Communis* L.)." *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant* 43 (1): 9–15. <http://www.jstor.org/stable/20461638>.
- Aishwariya, V, Ravindra Ramrao, E Kokila, L Arul, D Sudhakar, and K K Kumar. 2015. "IMPACT OF TDZ (THIDIAZURON) PULSE TREATMENT IN SINGLE AND MULTIPLE SHOOT FORMATION IN CALLI OF JATROPHA CURCAS L . [II] MATERIALS AND METHODS [III] RESULTS" 3 (3): 879–84.
- Alonso, José M., Anna N. Stepanova, Thomas J. Leisse, Christopher J. Kim, Huaming Chen, Paul Shinn, Denise K. Stevenson, et al. 2003. "Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis Thaliana*." *Science* 301 (5633): 653–57. <https://doi.org/10.1126/science.1086391>.
- Amin, Noor A L, Naveed Ahmad, W U Nan, F U Xiuming, Wang Nan, B O Xiaoxue, M A Tong, and Wang Piwu. 2018. "AN EFFICIENT TRANSIENT ASSAY FOR CRISPR CAS9 SYSTEM DELIVERING TARGETED MUTATION USING SYNTHETIC OLIGO SgRNA IN SOYBEAN (GLYCINE AN EFFICIENT TRANSIENT ASSAY FOR CRISPR CAS9 SYSTEM DELIVERING TARGETED MUTATION USING SYNTHETIC OLIGO SgRNA IN SOYBEAN (GLY," no. July.
- Amoo, Stephen O., Jeffrey F. Finnie, and Johannes van Staden. 2011. "The Role of Meta-Topolins in Alleviating Micropropagation Problems." *Plant Growth Regulation* 63 (2): 197–206. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9504-7>.
- Anand, Ajith, Steven H Bass, Emily Wu, Ning Wang, Kevin E McBride, Narayana Annaluru, Michael Miller, Mo Hua, and Todd J Jones. 2018. "An Improved Ternary Vector System for *Agrobacterium*-Mediated Rapid Maize Transformation." *Plant Molecular Biology* 97 (1–2): 187–200. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0732-y>.

- Anand, Ajith, Srinivasa Rao Uppalapati, Choong Min Ryu, Stacy N. Allen, Li Kang, Yuhong Tang, and Kirankumar S. Mysore. 2008. "Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance Play a Role in Attenuating Crown Gall Disease Caused by *Agrobacterium Tumefaciens*." *Plant Physiology* 146 (2): 703–15. <https://doi.org/10.1104/pp.107.111302>.
- Andersson, Anders F., and Jillian F. Banfield. 2008. "Virus Population Dynamics and Acquired Virus Resistance in Natural Microbial Communities." *Science* 320 (5879): 1047–50. <https://doi.org/10.1126/science.1157358>.
- Aremu, Adeyemi O., Michael W. Bairu, Karel Doležal, Jeffrey F. Finnie, and Johannes Van Staden. 2012. "Topolins: A Panacea to Plant Tissue Culture Challenges?" *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0007-7>.
- Bafor, M, M a Smith, L Jonsson, K Stobart, and S Stymne. 1991. "Ricinoleic Acid Biosynthesis and Triacylglycerol Assembly in Microsomal Preparations from Developing Castor-Bean (*Ricinus Communis*) Endosperm." *The Biochemical Journal* 280 (Pt 2: 507–14.
- Baghel, Sapna, and Yogendra Kumar Bansal. 2015. "In Vitro Regeneration of Oil Yielding Plants-A Review." *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 18 (5): 1022–50. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.971068>.
- Barrangou, Rodolphe, Christophe Fremaux, Hélène Deveau, Melissa Richards, Patrick Boyaval, Sylvain Moineau, Dennis A. Romero, and Philippe Horvath. 2007. "CRISPR Provides Acquired Resistance against Viruses in Prokaryotes." *Science* 315 (5819): 1709–12. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>.
- Berman, Paula, Shahar Nizri, and Zeev Wiesman. 2011a. "Castor Oil Biodiesel and Its Blends as Alternative Fuel." *Biomass and Bioenergy* 35 (7): 2861–66. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.03.024>.
- . 2011b. "Castor Oil Biodiesel and Its Blends as Alternative Fuel." *Biomass and Bioenergy* 35 (7): 2861–66. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.03.024>.
- Bhojwani, S. S. (Sant Saran), and M. K. Razdan. 1996. *Plant Tissue Culture : Theory and Practice*. Elsevier.
- Birch, R G. 1997. "PLANT TRANSFORMATION: Problems and Strategies for Practical Application." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48 (June): 297–326. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.297>.
- Borgato, L., F. Pisani, and A. Furini. 2007. "Plant Regeneration from Leaf Protoplasts of *Solanum Virginianum* L. (Solanaceae)." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88 (3): 247–52. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9196-x>.
- Boyes, C.J., F.J. Zapata, and K.C. Sink. 1980. "Isolation, Culture and Regeneration to Plants of Callus Protoplasts of *Salpiglossis Sinuata* L." *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie* 99 (5):

- 471–74. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(80\)80162-0](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(80)80162-0).
- Broun, P, S Boddupalli, and C Somerville. 1998. “A Bifunctional Oleate 12-Hydroxylase: Desaturase from *Lesquerella fendleri*.” *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 13 (2): 201–10. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00023.x>.
- Brown, Adrian P., Johan T M Kroon, David Swarbreck, Melanie Febrer, Tony R. Larson, Ian A. Graham, Mario Caccamo, and Antoni R. Slabas. 2012. “Tissue-Specific Whole Transcriptome Sequencing in Castor, Directed at Understanding Triacylglycerol Lipid Biosynthetic Pathways.” *PLoS ONE* 7 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030100>.
- Caiveau, Olivier, Dominique Fortune, Catherine Cantrel, Alain Zachowski, and François Moreau. 2001. “Consequences of ω -6-Oleate Desaturase Deficiency on Lipid Dynamics and Functional Properties of Mitochondrial Membranes of *Arabidopsis thaliana*.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (8): 5788–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006231200>.
- Carte, Jason, Ruiying Wang, Hong Li, Rebecca M. Terns, and Michael P. Terns. 2008. “Cas6 Is an Endoribonuclease That Generates Guide RNAs for Invader Defense in Prokaryotes.” *Genes and Development* 22 (24): 3489–96. <https://doi.org/10.1101/gad.1742908>.
- Caspi, Ron, Tomer Altman, Richard Billington, Kate Dreher, Hartmut Foerster, Carol A. Fulcher, Timothy A. Holland, et al. 2014. “The MetaCyc Database of Metabolic Pathways and Enzymes and the BioCyc Collection of Pathway/Genome Databases.” *Nucleic Acids Research* 42 (D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1103>.
- Chan, Agnes P., Jonathan Crabtree, Qi Zhao, Hernan Lorenzi, Joshua Orvis, Daniela Puiu, Admasu Melake-Berhan, Kristine M. Jones, Julia Redman, Grace Chen, Edgar B. Cahoon, Melaku Gedil, Mario Stanke, Brian J. Haas, Jennifer R. Wortman, Claire M. Fraser-Liggett, Jacques Ravel, and Pablo D. Rabinowicz. 2010. “Draft Genome Sequence of the Oilseed Species *Ricinus communis*.” *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.1674>.
- Chan, Agnes P, Jonathan Crabtree, Qi Zhao, Hernan Lorenzi, Joshua Orvis, Daniela Puiu, Admasu Melake-Berhan, Kristine M Jones, Julia Redman, Grace Chen, Edgar B Cahoon, Melaku Gedil, Mario Stanke, Brian J Haas, Jennifer R Wortman, Claire M Fraser-Liggett, Jacques Ravel, Pablo D Rabinowicz, et al. 2010. “Draft Genome Sequence of the Ricin-Producing Oilseed Castor Bean.” *Nat Biotechnol*. <https://doi.org/10.1038/nbt.1674>.
- Chauhan, Raj Deepika, and Nigel James Taylor. 2018. “Meta-Topolin Stimulates de Novo Shoot Organogenesis and Plant Regeneration in Cassava.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 132 (1): 219–24. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1315-3>.
- Chen, Jiang, Qiang Yi, Qiaoheng Song, Yong Gu, Junjie Zhang, Yufeng Hu, Hanmei Liu, Yinghong Liu, Guowu Yu, and Yubi Huang. 2015. “A Highly Efficient Maize Nucellus Protoplast System for Transient Gene Expression and Studying Programmed Cell Death-Related Processes.” *Plant Cell Reports* 34 (7): 1239–51. <https://doi.org/10.1007/s00299->

015-1783-z.

- Citovsky, Vitaly, Guido De Vos, and Patricia Zambryski. 1988. "Single-Stranded DNA Binding Protein Encoded by the VirE Locus of *Agrobacterium Tumefaciens*." *Science* 240 (4851): 501–4. <https://doi.org/10.1126/science.240.4851.501>.
- Cocking, E. C. 1960. "A Method for the Isolation of Plant Protoplasts and Vacuoles." *Nature* 187 (4741): 962–63. <https://doi.org/10.1038/187962a0>.
- Conde, Paula, and Conceição Santos. 2006. "An Efficient Protocol for *Ulmus Minor* Mill. Protoplast Isolation and Culture in Agarose Droplets." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86 (3): 359–66. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9122-2>.
- Corbett Research. n.d. "High Resolution Melt Assay Design and Analysis, Rotor-Gene 6000," 1–24.
- Cui, Jin, Kathryn Kuligowska Mackenzie, Tom Eeckhaut, Renate Müller, and Henrik Lütken. 2019. "Protoplast Isolation and Culture from *Kalanchoë* Species: Optimization of Plant Growth Regulator Concentration for Efficient Callus Production." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 138 (2): 287–97. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01624-4>.
- Davey, Michael R., Paul Anthony, J. Brian Power, and Kenneth C. Lowe. 2005. "Plant Protoplasts: Status and Biotechnological Perspectives." *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.09.008>.
- deFramond, Annick J., Kenneth A. Barton, and Mary Dell Chilton. 1983. "Mini-Ti: A New Vector Strategy for Plant Genetic Engineering." *Bio/Technology* 1 (3): 262–69. <https://doi.org/10.1038/nbt0583-262>.
- Deore, Ajay C., and T. Sudhakar Johnson. 2008. "High-Frequency Plant Regeneration from Leaf-Disc Cultures of *Jatropha Curcas* L.: An Important Biodiesel Plant." *Plant Biotechnology Reports* 2 (1): 7–11. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0042-y>.
- Deveau, Hélène, Josiane E. Garneau, and Sylvain Moineau. 2010. "CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions." *Annual Review of Microbiology* 64 (1): 475–93. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134123>.
- Díez-Villaseñor, C., C. Almendros, J. García-Martínez, and F. J.M. Mojica. 2010. "Diversity of CRISPR Loci in *Escherichia Coli*." *Microbiology* 156 (5): 1351–61. <https://doi.org/10.1099/mic.0.036046-0>.
- Doty, Sharon Lafferty, M. Christina Yu, J. Ingrid Lundin, Joe Don Heath, and Eugene W. Nester. 1996. "Mutational Analysis of the Input Domain of the VirA Protein of *Agrobacterium Tumefaciens*." *Journal of Bacteriology* 178 (4): 961–70. <https://doi.org/10.1128/jb.178.4.961-970.1996>.

- Durrenberger, F., A. Cramer, B. Hohn, and Z. Koukolikova-Nicola. 1989. "Covalently Bound VirD2 Protein of *Agrobacterium Tumefaciens* Protects the T-DNA from Exonucleolytic Degradation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (23): 9154–58. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9154>.
- Er, Tze Kiong, and Jan Gowth Chang. 2012. "High-Resolution Melting: Applications in Genetic Disorders." *Clinica Chimica Acta*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.09.012>.
- Erp, Harrie van, Philip D. Bates, Julie Burgal, Jay Shockey, and John Browse. 2011. "Castor Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferase Facilitates Efficient Metabolism of Hydroxy Fatty Acids in Transgenic Arabidopsis." *Plant Physiology* 155 (2): 683–93. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167239>.
- Escobar, Matthew A., and Abhaya M. Dandekar. 2003. "Agrobacterium Tumefaciens as an Agent of Disease." *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00162-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00162-6).
- Fehér, Attila. 2019. "Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology?" *Frontiers in Plant Science* 10 (April): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>.
- Ganesh Kumari, K., M. Ganesan, and N. Jayabalan. 2008. "Somatic Organogenesis and Plant Regeneration in *Ricinus Communis*." *Biologia Plantarum* 52 (1): 17–25. <https://doi.org/10.1007/s10535-008-0003-x>.
- Gelvin, S. B. 2003. "Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: The Biology behind the 'Gene-Jockeying' Tool." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (1): 16–37. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.1.16-37.2003>.
- Ghedira, Rim, Sylvie De Buck, Jonah Nolf, and Ann Depicker. 2013. "The Efficiency of Arabidopsis Thaliana Floral Dip Transformation Is Determined Not Only by the Agrobacterium Strain Used but Also by the Physiology and the Ecotype of the Dipped Plant." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26 (7): 823–32. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-12-0267-R>.
- Gil-Correal, Alejandro, Catalina Restrepo-Osorio, Javier Correa Álvarez, and Diego Fernando Villanueva-Mejía. 2019. "Direct in Vitro Regeneration of Castor Bean Plants (*Ricinus Communis*) Using Epicotyls." *Bioscience Journal* 35 (2): 347–55. <https://doi.org/10.14393/BJ-v35n2a2019-41475>.
- Gohlke, Jochen, and Rosalia Deeken. 2014. "Plant Responses to *Agrobacterium Tumefaciens* and Crown Gall Development." *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00155>.
- "Guidance on the Agronomic and Phenotypic Characterisation of Genetically Modified Plants."

2016. *EFSA Journal* 13 (6). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4128>.
- Guohua, Ma. 1998. "Effects of Cytokinins and Auxins on Cassava Shoot Organogenesis and Somatic Embryogenesis from Somatic Embryo Explants." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1023/A:1006065120629>.
- Hale, Caryn R., Peng Zhao, Sara Olson, Michael O. Duff, Brenton R. Graveley, Lance Wells, Rebecca M. Terns, and Michael P. Terns. 2009. "RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex." *Cell* 139 (5): 945–56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.040>.
- Hanahan, Douglas. 1983. "Studies on Transformation of Escherichia Coli with Plasmids." *Journal of Molecular Biology* 166 (4): 557–80. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8).
- Haque, Effi, Hiroaki Taniguchi, Md Mahmudul Hassan, Pankaj Bhowmik, M. Rezaul Karim, Magdalena Śmiech, Kaijun Zhao, Mahfuzur Rahman, and Tofazzal Islam. 2018. "Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technology for the Improvement of Crops Cultivated in Tropical Climates: Recent Progress, Prospects, and Challenges." *Frontiers in Plant Science* 9 (May): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00617>.
- Harwood, John L. 1996. "Recent Advances in the Biosynthesis of Plant Fatty Acids." *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*. Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(95\)00242-1](https://doi.org/10.1016/0005-2760(95)00242-1).
- Heigwer, Florian, Grainne Kerr, and Michael Boutros. 2014. "E-CRISP: Fast CRISPR Target Site Identification." *Nature Methods* 11 (2): 122–23. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2812>.
- Heppard, Elmer P., Anthony J. Kinney, Kevin L. Stecca, and Guo Hua Miao. 1996. "Developmental and Growth Temperature Regulation of Two Different Microsomal ω -6 Desaturase Genes in Soybeans." *Plant Physiology* 110 (1): 311–19. <https://doi.org/10.1104/pp.110.1.311>.
- Herrera-Estrella, A., M. Van Montagu, and K. Wang. 1990. "A Bacterial Peptide Acting as a Plant Nuclear Targeting Signal: The Amino-Terminal Portion of Agrobacterium VirD2 Protein Directs a β -Galactosidase Fusion Protein into Tobacco Nuclei." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (24): 9534–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.24.9534>.
- Hoekema, A., P. R. Hirsch, P. J.J. Hooykaas, and R. A. Schilperoort. 1983. "A Binary Plant Vector Strategy Based on Separation of Vir- and T-Region of the Agrobacterium Tumefaciens Ti-Plasmid." *Nature* 303 (5913): 179–80. <https://doi.org/10.1038/303179a0>.
- Horgan, R., E. W. Hewett, J. M. Horgan, J. Purse, and P. F. Wareing. 1975. "A New Cytokinin from Populus x Robusta." *Phytochemistry* 14 (4): 1005–8. [65](https://doi.org/10.1016/0031-</p></div><div data-bbox=)

9422(75)85176-4.

- Horsch, Robert B., Robert T. Fraley, Stephen G. Rogers, Patricia R. Sanders, Alan Lloyd, and Nancy Hoffmann. 1984. "Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants." *Science* 223 (4635): 496–98. <https://doi.org/10.1126/science.223.4635.496>.
- Horvath, Philippe, Dennis A. Romero, Anne Claire Coûté-Monvoisin, Melissa Richards, Hélène Deveau, Sylvain Moineau, Patrick Boyaval, Christophe Fremaux, and Rodolphe Barrangou. 2008. "Diversity, Activity, and Evolution of CRISPR Loci in *Streptococcus Thermophilus*." *Journal of Bacteriology* 190 (4): 1401–12. <https://doi.org/10.1128/JB.01415-07>.
- Hsu, Patrick D., David A. Scott, Joshua A. Weinstein, F. Ann Ran, Silvana Konermann, Vineeta Agarwala, Yingqin Li, et al. 2013. "DNA Targeting Specificity of RNA-Guided Cas9 Nucleases." *Nature Biotechnology* 31 (9): 827–32. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>.
- Hu, Qiong, Sven B. Andersen, and Lise N. Hansen. 1999. "Plant Regeneration Capacity of Mesophyll Protoplasts from *Brassica Napus* and Related Species." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59 (3): 189–96. <https://doi.org/10.1023/A:1006417530587>.
- Hu, Xiaozhen, Jinlei Zhao, William F. DeGrado, and Andrew N. Binns. 2013. "Agrobacterium Tumefaciens Recognizes Its Host Environment Using ChvE to Bind Diverse Plant Sugars as Virulence Signals." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (2): 678–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215033110>.
- Hurtado M., Daniel V., and María Eugenia. Merino M. 1987. *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Editorial Trillas.
- HWANG, HAU-HSUAN, MING-HSUAN WANG, YING-LING LEE, YUN-LONG TSAI, YI-HO LI, FONG-JHIH YANG, YU-CHEN LIAO, SHAO-KAI LIN, and ERH-MIN LAI. 2010. "Agrobacterium-Produced and Exogenous Cytokinin-Modulated Agrobacterium-Mediated Plant Transformation." *Molecular Plant Pathology*, June, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00637.x>.
- Hwang, Hau-Hsuan, Manda Yu, and Erh-Min Lai. 2017. "Agrobacterium -Mediated Plant Transformation: Biology and Applications ." *The Arabidopsis Book* 15: e0186. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>.
- Hwang, Woong Y., Yanfang Fu, Deepak Reyon, Morgan L. Maeder, Shengdar Q. Tsai, Jeffry D. Sander, Randall T. Peterson, J. R. Joanna Yeh, and J. Keith Joung. 2013. "Efficient Genome Editing in Zebrafish Using a CRISPR-Cas System." *Nature Biotechnology* 31 (3): 227–29. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>.
- Ikeuchi, Momoko, Keiko Sugimoto, and Akira Iwase. 2013. "Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression." *Plant Cell*. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>.
- Jeong, Gwi Taek, and Don Hee Park. 2009. "Optimization of Biodiesel Production from Castor

- Oil Using Response Surface Methodology.” In *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 156:1–11. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8468-9>.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. “A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.” *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096): 816–21. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
- Jinek, Martin, Alexandra East, Aaron Cheng, Steven Lin, Enbo Ma, and Jennifer Doudna. 2013. “RNA-Programmed Genome Editing in Human Cells.” *ELife* 2 (January): e00471. <https://doi.org/10.7554/eLife.00471>.
- Kanemoto, R. H., A. T. Powell, D. E. Akiyoshi, D. A. Regier, R. A. Kerstetter, E. W. Nester, M. C. Hawes, and M. P. Gordon. 1989. “Nucleotide Sequence and Analysis of the Plant-Inducible Locus *PinF* from *Agrobacterium Tumefaciens*.” *Journal of Bacteriology* 171 (5): 2506–12. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2506-2512.1989>.
- Keane, P. J., A. Kerr, and P. B. New. 1970. “Crown Gall of Stone Fruit Ii. Identification and Nomenclature of *Agrobacterium* Isolates.” *Australian Journal of Biological Sciences* 23 (3): 585–96. <https://doi.org/10.1071/Bi9700585>.
- Kearns, Ellen V., Suzanne Hugly, and Chris R. Somerville. 1991. “The Role of Cytochrome B5 in $\Delta 12$ Desaturation of Oleic Acid by Microsomes of Safflower (*Carthamus Tinctorius* L.).” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 284 (2): 431–36. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90319-E](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90319-E).
- Komari, Toshihiko, Yuji Ishida, and Yukoh Hiei. 2004. “Plant Transformation Technology: *Agrobacterium* -Mediated Transformation.” In *Handbook of Plant Biotechnology*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470869143.kc014>.
- Kregten, Maartje Van, Beatrice I. Lindhout, Paul J.J. Hooykaas, and Bert J. Van Der Zaal. 2009. “*Agrobacterium*-Mediated T-DNA Transfer and Integration by Minimal *Vird2* Consisting of the Relaxase Domain and a Type IV Secretion System Translocation Signal.” *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22 (11): 1356–65. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-11-1356>.
- Kreněk, Pavel, Olga Samajová, Ivan Luptovciak, Anna Doskocilová, George Komis, and Jozef Samaj. 2015. “Transient Plant Transformation Mediated by *Agrobacterium Tumefaciens*: Principles, Methods and Applications.” *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.012>.
- Kuluev, B. R., G. R. Gumerova, E. V. Mikhaylova, G. A. Gerashchenkov, N. A. Rozhnova, Z. R. Vershinina, A. V. Khyazev, et al. 2019. “Delivery of CRISPR/Cas Components into Higher Plant Cells for Genome Editing.” *Russian Journal of Plant Physiology* 66 (5): 694–706. <https://doi.org/10.1134/S102144371905011X>.

- Kumlehn, Jochen, Janine Pietralla, Goetz Hensel, Michael Pacher, and Holger Puchta. 2018. “The CRISPR/Cas Revolution Continues: From Efficient Gene Editing for Crop Breeding to Plant Synthetic Biology.” *Journal of Integrative Plant Biology*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jipb.12734>.
- Lacroix, Benoît, and Vitaly Citovsky. 2018. “Beyond Agrobacterium-Mediated Transformation: Horizontal Gene Transfer from Bacteria to Eukaryotes.” In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 418:443–62. Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/82_2018_82.
- Lacroix, Benoît, Tzvi Tzfira, Alexander Vainstein, and Vitaly Citovsky. n.d. “A Case of Promiscuity: Agrobacterium’s Endless Hunt for New Partners.” Accessed January 30, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.10.004>.
- Larebeke, N. Van, G. Engler, M. Holsters, S. Van Den Elsacker, I. Zaenen, R. A. Schilperoort, and J. Schell. 1974. “Large Plasmid in Agrobacterium Tumefaciens Essential for Crown Gall-Inducing Ability.” *Nature* 252 (5479): 169–70. <https://doi.org/10.1038/252169a0>.
- Lee, Chil Woo, Marina Efetova, Julia C. Engelmann, Robert Kramell, Claus Wasternack, Jutta Ludwig-Müller, Rainer Hedrich, and Rosalia Deeken. 2009. “Agrobacterium Tumefaciens Promotes Tumor Induction by Modulating Pathogen Defense in Arabidopsis Thaliana.” *Plant Cell* 21 (9): 2948–62. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064576>.
- Lee, Haeng S., Suk W. Kim, Kwang W. Lee, Tage Eriksson, and Jang R. Liu. 1995. “Agrobacterium-Mediated Transformation of Ginseng (Panax Ginseng) and Mitotic Stability of the Inserted β -Glucuronidase Gene in Regenerants from Isolated Protoplasts.” *Plant Cell Reports* 14 (9): 545–49. <https://doi.org/10.1007/BF00231935>.
- Lee, Yong Woog, Shouguang Jin, Woong Seop Sim, and Eugene W. Nester. 1996. “The Sensing of Plant Signal Molecules by Agrobacterium: Genetic Evidence for Direct Recognition of Phenolic Inducers by the VirA Protein.” *Gene* 179 (1): 83–88. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00328-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00328-9).
- Lemmon, Zachary H., Nathan T. Reem, Justin Dalrymple, Sebastian Soyk, Kerry E. Swartwood, Daniel Rodriguez-Leal, Joyce Van Eck, and Zachary B. Lippman. 2018. “Rapid Improvement of Domestication Traits in an Orphan Crop by Genome Editing.” *Nature Plants* 4 (10): 766–70. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0259-x>.
- Lessl, M, and E Lanka. 1994. “Common Mechanisms in Bacterial Conjugation and Ti-Mediated T-DNA Transfer to Plant Cells.” *Cell* 77 (3): 321–24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90146-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90146-5).
- Li, Shan, Songmei Liu, Yanhua Liu, Haiping Lu, Yuanyuan Tan, Jianzhong Huang, Pengcheng Wei, and Qing Yao Shu. 2018. “HRM-Facilitated Rapid Identification and Genotyping of Mutations Induced by CRISPR/ Cas9 Mutagenesis in Rice.” *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 18 (2): 184–91. <https://doi.org/10.1590/1984-70332018v18n2a26>.

- Lian, Yu Ji, Xiao Mei Zhao, Guang Zhe Lin, and Hak tae Lim. 2012. "Protoplast Isolation and Culture for Somatic Hybridisation of Rapid Cycling Brassica Rapa with 'Anand' CMS and Brassica Juncea." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109 (3): 565–72. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0114-0>.
- Lin, Choun Sea, Chen Tran Hsu, Ling Hung Yang, Lan Ying Lee, Jin Yuan Fu, Qiao Wei Cheng, Fu Hui Wu, et al. 2018. "Application of Protoplast Technology to CRISPR/Cas9 Mutagenesis: From Single-Cell Mutation Detection to Mutant Plant Regeneration." *Plant Biotechnology Journal*, 2018. <https://doi.org/10.1111/pbi.12870>.
- Lin, Jiann-Tsyh, and Arthur Arcinas. 2007. "Regiospecific Analysis of Diricinoleoylacylglycerols in Castor (*Ricinus Communis* L.) Oil by Electrospray Ionization–Mass Spectrometry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (6): 2209–16. <https://doi.org/10.1021/jf063105f>.
- Liu, Pu, and Eugene W. Nester. 2006. "Indoleacetic Acid, a Product of Transferred DNA, Inhibits Vir Gene Expression and Growth of Agrobacterium Tumefaciens C58." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (12): 4658–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600366103>.
- Liu, Ying, Yingbin Xue, Jianian Tang, Jianping Chen, and Miao Chen. 2019. "Ef Fi Cient Mesophyll Protoplast Isolation and Development of a Transient Expression System for Castor-Oil Plant (*Ricinus Communis* L .)." <https://doi.org/10.1556/019.70.2019.02>.
- Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method." *Methods* 25 (4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lloyd, Gregory, and Brent McCown. 1980. "Commercially-Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, Kalmia Latifolia, by Use of Shoot Tip Culture." *International Plant Propagators' Society Proceedings* 30.
- Lochlainn, Seosamh T., Stephen Amoah, Neil S. Graham, Khalid Alamer, Juan J. Rios, Smita Kurup, Andrew Stoute, et al. 2011. "High Resolution Melt (HRM) Analysis Is an Efficient Tool to Genotype EMS Mutants in Complex Crop Genomes." *Plant Methods* 7 (1): 43. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-43>.
- Loo, F. J. van de, P. Broun, S. Turner, and C. Somerville. 1995. "An Oleate 12-Hydroxylase from Ricinus Communis L. Is a Fatty Acyl Desaturase Homolog." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (15): 6743–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.6743>.
- Loo, Frank J. Van De, Pierre Broun, Simon Turner, and Chris Somerville. 1995. "An Oleate 12-Hydroxylase from Ricinus Communis L. Is a Fatty Acyl Desaturase Homolog." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (15): 6743–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.6743>.

- Lu, Chaofu, James G. Wallis, and John Browse. 2007. "An Analysis of Expressed Sequence Tags of Developing Castor Endosperm Using a Full-Length cDNA Library." *BMC Plant Biology* 7: 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-42>.
- Mahmoud, Sameer N, and Nabeel K Al-Ani. 2016. "Effect of Different Sterilization Methods on Contamination and Viability of Nodal Segments of *Cestrum Nocturnum* L." *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)* 4 (1): 4–9. <https://doi.org/10.20431/2349-0365.0401002>.
- Makarova, Kira S., Daniel H. Haft, Rodolphe Barrangou, Stan J.J. Brouns, Emmanuelle Charpentier, Philippe Horvath, Sylvain Moineau, et al. 2011. "Evolution and Classification of the CRISPR-Cas Systems." *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>.
- Mali, Prashant, Luhan Yang, Kevin M Esvelt, John Aach, Marc Guell, James E DiCarlo, Julie E Norville, and George M Church. 2013. "RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9." *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121): 823–26. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>.
- Marraffini, Luciano A., and Erik J. Sontheimer. 2008. "CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA." *Science* 322 (5909): 1843–45. <https://doi.org/10.1126/science.1165771>.
- Martineau, B., T. A. Voelker, and R. A. Sanders. 1994. "On Defining T-DNA." *The Plant Cell*, August, 1032–33. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.8.1032>.
- McKeon, T A, G Q Chen, and J T Lin. 2000. "Biochemical Aspects of Castor Oil Biosynthesis." *Biochemical Society Transactions* 28 (6): 972–74.
- Mederos Molina, Sebastiana, and Christian Schobert. 1995. "Micropropagation of *Ricinus Communis*." *Journal of Plant Physiology* 147 (2): 270–72. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81517-8](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81517-8).
- Metje-Sprink, Janina, Thorben Sprink, and Frank Hartung. 2020. "Genome-Edited Plants in the Field." *Current Opinion in Biotechnology* 61: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.08.007>.
- Miquel, M., and J. Browse. 1992. "Arabidopsis Mutants Deficient in Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis: Biochemical and Genetic Characterization of a Plant Oleoyl-Phosphatidylcholine Desaturase." *Journal of Biological Chemistry* 267 (3): 1502–9.
- Miquel, Martine, and J Browse. 1992. "Arabidopsis Mutants Deficient in Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis. Biochemical and Genetic Characterization of a Plant Oleoyl-Phosphatidylcholine Desaturase." *Journal of Biological Chemistry* 267 (3): 1502–9. <http://www.jbc.org/content/267/3/1502.abstract>.

- Modrzejewski, Dominik, Frank Hartung, Thorben Sprink, Dörthe Krause, Christian Kohl, and Ralf Wilhelm. 2019. "What Is the Available Evidence for the Range of Applications of Genome-Editing as a New Tool for Plant Trait Modification and the Potential Occurrence of Associated off-Target Effects: A Systematic Map." *Environmental Evidence* 8 (1). <https://doi.org/10.1186/s13750-019-0171-5>.
- Moreau, Robert A., and Paul K. Stumpf. 1981. "Recent Studies of the Enzymic Synthesis of Ricinoleic Acid by Developing Castor Beans." *Plant Physiology* 67 (4): 672–76. <https://doi.org/10.1104/pp.67.4.672>.
- Mroginski, LA, and William M. Roca. 1991. "Establecimiento de Cultivos de Tejidos Vegetales in Vitro."
- Naito, Yuki, Kimihiro Hino, Hidemasa Bono, and Kumiko Ui-Tei. 2015a. "CRISPRdirect: Software for Designing CRISPR/Cas Guide RNA with Reduced off-Target Sites." *Bioinformatics* 31 (7): 1120–23. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu743>.
- . 2015b. "CRISPRdirect: Software for Designing CRISPR/Cas Guide RNA with Reduced off-Target Sites." *Bioinformatics* 31 (7): 1120–23. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu743>.
- Nakamura, Manabu T., and Takayuki Y. Nara. 2004. "STRUCTURE, FUNCTION, AND DIETARY REGULATION OF $\Delta 6$, $\Delta 5$, AND $\Delta 9$ DESATURASES." *Annual Review of Nutrition* 24 (1): 345–76. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.121803.063211>.
- Nanjareddy, Kalpana, Lourdes Blanco, Manoj Kumar Arthikala, Xóchitl Alvarado-Affantranger, Carmen Quinto, Federico Sánchez, and Miguel Lara. 2016. "A Legume TOR Protein Kinase Regulates Rhizobium Symbiosis and Is Essential for Infection and Nodule Development." *Plant Physiology* 172 (3): 2002–20. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00844>.
- Narasimhulu, S B, X B Deng, R Sarria, and S B Gelvin. 1996. "Early Transcription of Agrobacterium T-DNA Genes in Tobacco and Maize." *The Plant Cell* 8 (5): 873–86. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.5.873>.
- Nishimura, Mikio, and Harry Beevers. n.d. "Isolation of Intact Plastids from Protoplasts from Castor Bean Endosperm." *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists (ASPB). Accessed January 30, 2020. <https://doi.org/10.2307/4265367>.
- . 1978. "Hydrolases in Vacuoles from Castor Bean Endosperm." *Plant Physiology* 62 (1): 44–48. <https://doi.org/10.1104/pp.62.1.44>.
- Nonaka, Satoko, Ken-Ichi Yuhashi, Keita Takada, Masayuki Sugaware, Kiwamu Minamisawa, and Hiroshi Ezura. 2008. "Ethylene Production in Plants during Transformation Suppresses Vir Gene Expression in *Agrobacterium Tumefaciens*." *New Phytologist* 178 (3): 647–56. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02400.x>.

- Ogunniyi, D. S. 2006. "Castor Oil: A Vital Industrial Raw Material." *Bioresource Technology* 97 (9): 1086–91. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.028>.
- Pellegrino, Elisa, Stefano Bedini, Marco Nuti, and Laura Ercoli. 2018. "Impact of Genetically Engineered Maize on Agronomic, Environmental and Toxicological Traits: A Meta-Analysis of 21 Years of Field Data." *Scientific Reports* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21284-2>.
- Perez Ponce, J.N, Y Alvarado, J Pérez, P Orellana, J.N. Pérez-Asensio, DE LA SERNA J PEREZ, D. Agramonte, et al. 1998. "Propagación y Mejora Genética de Plantas Por Biotecnología."
- Perry, Bruce A. 1943. "CHROMOSOME NUMBER AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS IN THE EUPHORBACEAE." *American Journal of Botany* 30 (7): 527–43. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1943.tb14796.x>.
- Pfaffl, Michael W, Ales Tichopad, Christian Prgomet, and Tanja P Neuvians. 2004. "Determination of Stable Housekeeping Genes, Differentially Regulated Target Genes and Sample Integrity: BestKeeper-Excel-Based Tool Using Pair-Wise Correlations." *Biotechnology Letters*. Vol. 26. <http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/bestkeeper.html>.
- Pierik, R.L.M. 1990. "Cultivo in Vitro de Las Plantas Superiores." *Ediciones Mundi Prensa, Madrid, Spain*.
- Pitzschke, Andrea, and Helene Persak. 2012. "Poinsettia Protoplasts - a Simple, Robust and Efficient System for Transient Gene Expression Studies." *Plant Methods* 8 (1). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-14>.
- Rampadarath, Sillma, and Daneshwar Puchooa. 2016. "In Vitro Antimicrobial and Larvicidal Properties of Wild Ricinus Communis L. in Mauritius." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6 (2): 100–107.
- Rao, K Sankara, and A H Prakash. 1995. "A Simple Method for the Isolation of Plant Protoplasts." *J. Biosci.* Vol. 20.
- Reed, Gudrun H., Jana O. Kent, and Carl T. Wittwer. 2007. "High-Resolution DNA Melting Analysis for Simple and Efficient Molecular Diagnostics." *Pharmacogenomics* 8 (6): 597–608. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.6.597>.
- Richards, Donald Earl, Rebecca D. Taylor, and Denis J. Murphy. 1993. "Localization and Possible Substrate Requirement of the Oleate 12-Hydroxylase of Developing Ricinus Communis Seeds."
- Ricroch, Agnès, Pauline Clairand, and Wendy Harwood. 2017. "Use of CRISPR Systems in Plant Genome Editing: Toward New Opportunities in Agriculture." *Emerging Topics in Life*

- Sciences* 1 (2): 169–82. <https://doi.org/10.1042/etls20170085>.
- Roberts, L M, F I Lamb, D J Pappin, and J M Lord. 1985. “The Primary Sequence of Ricinus Communis Agglutinin. Comparison with Ricin.” *The Journal of Biological Chemistry* 260 (29): 15682–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999130>.
- Roth, D. B., and J. H. Wilson. 1985. “Relative Rates of Homologous and Nonhomologous Recombination in Transfected DNA.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (10): 3355–59. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.10.3355>.
- Schindele, Angelina, Annika Dorn, and Holger Puchta. 2020. “CRISPR/Cas Brings Plant Biology and Breeding into the Fast Lane.” *Current Opinion in Biotechnology* 61: 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.08.006>.
- Schmidt, Hermann, Thomas Dresselhaus, Friedrich Buck, and Ernst Heinz. 1994. “Purification and PCR-Based cDNA Cloning of a Plastidial n-6 Desaturase.” *Plant Molecular Biology* 26 (2): 631–42. <https://doi.org/10.1007/BF00013749>.
- Schrammeijer, B, E Risseuw, W Pansegrau, T J Regensburg-Tuink, W L Crosby, and P J Hooykaas. 2001. “Interaction of the Virulence Protein VirF of *Agrobacterium Tumefaciens* with Plant Homologs of the Yeast Skp1 Protein.” *Current Biology : CB* 11 (4): 258–62. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00069-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00069-0).
- Shan, Qiwei, Yanpeng Wang, Jun Li, Yi Zhang, Kunling Chen, Zhen Liang, Kang Zhang, et al. 2013. “Targeted Genome Modification of Crop Plants Using a CRISPR-Cas System.” *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nbt.2650>.
- Shimoda, N, A Toyoda-Yamamoto, S Aoki, and Y Machida. 1993. “Genetic Evidence for an Interaction between the VirA Sensor Protein and the ChvE Sugar-Binding Protein of *Agrobacterium*.” *The Journal of Biological Chemistry* 268 (35): 26552–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8253785>.
- Shmakov, Sergey, Omar O. Abudayyeh, Kira S. Makarova, Yuri I. Wolf, Jonathan S. Gootenberg, Ekaterina Semenova, Leonid Minakhin, et al. 2015. “Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems.” *Molecular Cell* 60 (3): 385–97. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.008>.
- Simko, Ivan. 2016. “High-Resolution DNA Melting Analysis in Plant Research.” *Trends in Plant Science* 21 (6): 528–37. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.004>.
- Singer, Kamy Kalman. 2013. “T-DNA Integration during *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Plants.”
- Slabas, Antoni R., and Tony Fawcett. 1992. “The Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipid Biosynthesis.” *Plant Molecular Biology* 19 (1): 169–91. <https://doi.org/10.1007/BF00015613>.

- Smith, Erwin F., and C. O. Townsend. 1907. "A Plant-Tumor of Bacterial Origin." *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.25.643.671>.
- Smith, J. 2001. "The Influence of DNA Double-Strand Break Structure on End-Joining in Human Cells." *Nucleic Acids Research* 29 (23): 4783–92.
<https://doi.org/10.1093/nar/29.23.4783>.
- Smith, M. A., L. Jonsson, S. Stymne, and K. Stobart. 1992. "Evidence for Cytochrome B5 as an Electron Donor in Ricinoleic Acid Biosynthesis in Microsomal Preparations from Developing Castor Bean (*Ricinus Communis* L.)." *Biochemical Journal* 287 (1): 141–44.
<https://doi.org/10.1042/bj2870141>.
- Smith, Mark A., Hangsik Moon, Gangamma Chowrira, and Ljerka Kunst. 2003. "Heterologous Expression of a Fatty Acid Hydroxylase Gene in Developing Seeds of Arabidopsis Thaliana." *Planta* 217 (3): 507–16. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1015-6>.
- Soares, Douglas Moraes Mendel, Mariana Cansian Sattler, Marcia Flores da Silva Ferreira, and Milene Miranda Praça-Fontes. 2016. "Assessment of Genetic Stability in Three Generations of In Vitro Propagated *Jatropha Curcas* L. Plantlets Using ISSR Markers." *Tropical Plant Biology* 9 (4): 229–38. <https://doi.org/10.1007/s12042-016-9171-6>.
- Solórzano-Cascante, Paúl, Neiva Sánchez-Chiang, and Víctor M. Jiménez. 2018. "Explant Type, Culture System, 6-Benzyladenine, Meta-Topolin and Encapsulation Affect Indirect Somatic Embryogenesis and Regeneration in *Carica Papaya* L." *Frontiers in Plant Science* 871 (December): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01769>.
- Sparkes, Imogen A., John Runions, Anne Kearns, and Chris Hawes. 2006. "Rapid, Transient Expression of Fluorescent Fusion Proteins in Tobacco Plants and Generation of Stably Transformed Plants." *Nature Protocols* 1 (4): 2019–25.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.286>.
- Stachel, Scott E., Eric Messens, Marc Van Montagu, and Patricia Zambryski. 1985. "Identification of the Signal Molecules Produced by Wounded Plant Cells That Activate T-DNA Transfer in *Agrobacterium Tumefaciens*." *Nature* 318 (6047): 624–29.
<https://doi.org/10.1038/318624a0>.
- Stoutjesdijk, Peter A., Surinder P. Singh, Qing Liu, Clive J. Hurlstone, Peter A. Waterhouse, and Allan G. Green. 2002. "HpRNA-Mediated Targeting of the Arabidopsis FAD2 Gene Gives Highly Efficient and Stable Silencing." *Plant Physiology* 129 (4): 1723–31.
<https://doi.org/10.1104/pp.006353>.
- Strauss, Steven H, and Joanna K Sax. 2016. "Ending Event-Based Regulation of GMO Crops." *Nature Biotechnology* 34 (5): 474–77. <https://doi.org/10.1038/nbt.3541>.
- Subramoni, Sujatha, Naeem Nathoo, Eugene Klimov, and Ze Chun Yuan. 2014. "Agrobacterium

- Tumefaciens Responses to Plant-Derived Signaling Molecules.” *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00322>.
- Sujatha, M., T. P. Reddy, and M. J. Mahasi. 2008a. “Role of Biotechnological Interventions in the Improvement of Castor (*Ricinus Communis* L.) and *Jatropha Curcas* L.” *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.004>.
- . 2008b. “Role of Biotechnological Interventions in the Improvement of Castor (*Ricinus Communis* L.) and *Jatropha Curcas* L.” *Biotechnology Advances* 26 (5): 424–35. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.004>.
- Sujatha, M, H P S Makkar, and K Becker. 2005. “Shoot Bud Proliferation from Axillary Nodes and Leaf Sections of Non-Toxic *Jatropha Curcas* L.” *Plant Growth Regulation* 47 (1): 83–90. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-0859-0>.
- Sujatha, M, and T P Reddy. 1998. “Differential Cytokinin Effects on the Stimulation of in Vitro Shoot Proliferation from Meristematic Explants of Castor (*Ricinus Communis* L.).” *Plant Cell Reports* 17 (6): 561–66. <https://doi.org/10.1007/s002990050442>.
- Taylor, Sean, Rachel Scott, Richard Kurtz, Carl Fisher, and Viresh Patel. 2009. “A Practical Guide to High Resolution Melt Analysis Genotyping.” *Bio-Rad Laboratories Technical Note*. <http://www.americanbiotechnologist.com/blog/wp-content/uploads/2010/10/HRM-tech-note.pdf>.
- Terns, Rebecca M., and Michael P. Terns. 2014. “CRISPR-Based Technologies: Prokaryotic Defense Weapons Repurposed.” *Trends in Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.01.003>.
- Thomas, Thuruthiyil Dennis, and Rakhi Chaturvedi. 2008. “Endosperm Culture: A Novel Method for Triploid Plant Production.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9336-6>.
- Thurtle-Schmidt, Deborah M., and Te Wen Lo. 2018. “Molecular Biology at the Cutting Edge: A Review on CRISPR/CAS9 Gene Editing for Undergraduates.” *Biochemistry and Molecular Biology Education* 46 (2): 195–205. <https://doi.org/10.1002/bmb.21108>.
- Tian, Shouwei, Linjian Jiang, Qiang Gao, Jie Zhang, Mei Zong, Haiying Zhang, Yi Ren, et al. 2017. “Efficient CRISPR/Cas9-Based Gene Knockout in Watermelon.” *Plant Cell Reports* 36 (3): 399–406. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2089-5>.
- Tudses, Nootjaree, Siripong Premjet, and Duangporn Premjet. 2014. “Optimal Conditions for High-Yield Protoplast Isolations of *Jatropha Curcas* L . And *Ricinus Communis* L Optimal Conditions for High-Yield Protoplast Isolations Of,” no. May. <https://doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2014.14.03.12313>.
- . 2015. “Establishment of Method for Protoplast Fusion with PEG-Mediated between

- Jatropha Curcas* L. and *Ricinus Communis* L.,” no. January.
- Vanaja, M., M. Jyothi, P. Ratnakumar, P. Vagheera, P. Raghuram Reddy, N. Jyothi Lakshmi, S.K. Yadav, M. Maheshwari, and B. Venkateswarlu. 2018. “Growth and Yield Responses of Castor Bean (*Ricinus Communis* L.) at Two Enhanced CO₂ Levels.” *Plant, Soil and Environment* 54 (No. 1): 38–46. <https://doi.org/10.17221/386-pse>.
- Vandesompele, J., Katleen De Preter, Filip Pattyn, Bruce Poppe, Nadine Van Roy, Anne De Paepe, and Frank Speleman. 2002. “Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes.” *Genome Biology* 3 (7). <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.
- Vergunst, Annette C., Miranda C.M. Van Lier, Amke Den Dulk-Ras, Thomas A. Grosse Stüve, Anette Ouwehand, and Paul J.J. Hooykaas. 2005. “Positive Charge Is an Important Feature of the C-Terminal Transport Signal of the VirB/D4-Translocated Proteins of *Agrobacterium*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (3): 832–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406241102>.
- Vijayakumar, Jeyachandran, Ponnirul Ponmanickam, P. Samuel, D. N. P. Sudarmani, and J. Pandiarajan. 2017. “Influence of Meta-Topolin on Efficient Plant Regeneration via Micropropagation and Organogenesis of Safflower (&I>Carthamus Tinctorius&I> L.) Cv. NARI-H-15.” *American Journal of Plant Sciences* 08 (04): 688–705. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.84048>.
- Villanueva-Mejía, Diego F. 2018. “Modern Biotechnology for Agricultural Development in Colombia.” *Ingeniería y Ciencia* 14 (28): 169–94. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.14.28.7>.
- Virts, E. L., and S. B. Gelvin. 1985. “Analysis of Transfer of Tumor-Inducing Plasmids from *Agrobacterium Tumefaciens* to *Petunia* Protoplasts.” *Journal of Bacteriology* 162 (3): 1030–38.
- Wang, Lijun, Xiaoling Jiang, Lei Wang, Wei Wang, Chunling Fu, Xingchu Yan, and Xinxin Geng. 2019a. “A Survey of Transcriptome Complexity Using PacBio Single-Molecule Real-Time Analysis Combined with Illumina RNA Sequencing for a Better Understanding of Ricinoleic Acid Biosynthesis in *Ricinus Communis*.” *BMC Genomics* 20 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5832-9>.
- . 2019b. “A Survey of Transcriptome Complexity Using PacBio Single-Molecule Real-Time Analysis Combined with Illumina RNA Sequencing for a Better Understanding of Ricinoleic Acid Biosynthesis in *Ricinus Communis*.” *BMC Genomics* 20 (1): 456. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5832-9>.
- Wang, Tim, Jenny J Wei, David M Sabatini, and Eric S Lander. 2014. “Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System.” *Science* 343 (6166): 80 LP – 84.

- <https://doi.org/10.1126/science.1246981>.
- Weber, Hans. 2002. "Fatty Acid-Derived Signals in Plants." *Trends in Plant Science* 7 (5): 217–24. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02250-1](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02250-1).
- Wiedenheft, Blake, Esther Van Duijn, Jelle Bultema, Saktham Waghmare, Kaihong Zhou, Arjan Barendregt, Wiebke Westphal, et al. 2011. "RNA-Guided Complex from a Bacterial Immune System Enhances Target Recognition through Seed Sequence Interactions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (25): 10092–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102716108>.
- Willig, Christopher J., Kaixuan Duan, and Zhanyuan J. Zhang. 2018. "Transcriptome Profiling of Plant Genes in Response to *Agrobacterium Tumefaciens*-Mediated Transformation." In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 418:319–48. Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/82_2018_115.
- Wojciechowska-Durczyńska, Katarzyna, Kinga Krawczyk-Rusiecka, Anna Cyniak-Magierska, Arkadiusz Zygmunt, Elżbieta Gałęcka, and Andrzej Lewiński. 2010. "Relative Quantification of PIK3CA Gene Expression Level in Fine-Needle Aspiration Biopsy Thyroid Specimens Collected from Patients with Papillary Thyroid Carcinoma and Non-Toxic Goitre by Real-Time RT-PCR." *Thyroid Research* 3 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/1756-6614-3-5>.
- Woo, Je Wook, Jungeun Kim, Soon Il Kwon, Claudia Corvalán, Seung Woo Cho, Hyeran Kim, Sang Gyu Kim, Sang Tae Kim, Sunghwa Choe, and Jin Soo Kim. 2015. "DNA-Free Genome Editing in Plants with Preassembled CRISPR-Cas9 Ribonucleoproteins." *Nature Biotechnology* 33 (11): 1162–64. <https://doi.org/10.1038/nbt.3389>.
- Wu, Jun Zheng, Qin Liu, Xiao Shan Geng, Kai Mian Li, Li Juan Luo, and Jin Ping Liu. 2017. "Highly Efficient Mesophyll Protoplast Isolation and PEG-Mediated Transient Gene Expression for Rapid and Large-Scale Gene Characterization in Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz)." *BMC Biotechnology*. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0349-2>.
- Yao, Liping, Xiong Liao, Zhizhe Gan, Xiang Peng, Peng Wang, Shaojuan Li, and Tianhong Li. 2016. "Protoplast Isolation and Development of a Transient Expression System for Sweet Cherry (*Prunus Avium* L.)." *Scientia Horticulturae* 209 (September): 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.003>.
- Yoo, Sang Dong, Young Hee Cho, and Jen Sheen. 2007. "Arabidopsis Mesophyll Protoplasts: A Versatile Cell System for Transient Gene Expression Analysis." *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199>.
- Young, C., and E. W. Nester. 1988. "Association of the VirD2 Protein with the 5' End of T Strands in *Agrobacterium Tumefaciens*." *Journal of Bacteriology* 170 (8): 3367–74. <https://doi.org/10.1128/jb.170.8.3367-3374.1988>.

- Zastrow-Hayes, Gina M., Haining Lin, Amy L. Sigmund, Jenna L. Hoffman, Clara M. Alarcon, Kevin R. Hayes, Todd A. Richmond, Jeffery A. Jeddloh, Gregory D. May, and Mary K. Beatty. 2015. “Southern-by-Sequencing: A Robust Screening Approach for Molecular Characterization of Genetically Modified Crops.” *Plant Genome* 8 (1). <https://doi.org/10.3835/plantgenome2014.08.0037>.
- Zetsche, Bernd, Jonathan S. Gootenberg, Omar O. Abudayyeh, Ian M. Slaymaker, Kira S. Makarova, Patrick Essletzbichler, Sara E. Volz, et al. 2015. “Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System.” *Cell* 163 (3): 759–71. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>.
- Zhang, Ji Xing, Xiao Yu Wang, Zi Zhou Feng, Xue Jun Geng, Sha Moli Mu, Hong Yan Huo, Huan Tong, et al. 2016. “In Vitro Establishment of a Highly Effective Method of Castor Bean (*Ricinus Communis* L.) Regeneration Using Shoot Explants.” *Journal of Integrative Agriculture* 15 (6): 1417–22. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61286-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61286-2).
- Zhi, Li, Susan TeRonde, Sandra Meyer, Maren L. Arling, James C. Register, Zuo Yu Zhao, Todd J. Jones, and Ajith Anand. 2015. “Effect of Agrobacterium Strain and Plasmid Copy Number on Transformation Frequency, Event Quality and Usable Event Quality in an Elite Maize Cultivar.” *Plant Cell Reports* 34 (5): 745–54. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1734-0>.

Capítulo II. Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

2.1. Introducción

Los aceites vegetales que provienen principalmente de las semillas o frutos de ciertos cultivos son empleados usualmente para alimentación y a nivel industrial. La composición de estos aceites es en gran medida triacilglicerol (TAG) y algunos elementos trazas como componentes orgánicos (esteroides, antioxidantes, entre otros). Los ácidos grasos que poseen la mayoría de las plantas son empleados como una importante reserva energética, adicionalmente, están implicados en procesos metabólicos de la planta, componentes estructurales membranales y precursores de moléculas señalizadoras que se ven involucradas en procesos de desarrollo y respuesta a estrés (Harwood 1996; Weber 2002).

La biotecnología moderna nos ofrece metodologías y técnicas hacia el mejoramiento genético o para potencializar características deseables en la planta, como es el caso de incrementar el contenido de ácidos grasos de interés en las plantas. No obstante, para obtener plantas de *R. communis* mejoradas genéticamente, es necesario también entender las redes metabólicas implicadas en la síntesis de los compuestos de interés.

Es por lo anterior que, en este capítulo, se abordó el estudio de la composición de los ácidos grasos presentes en la planta de higuera; principalmente en la biosíntesis del ácido ricinoleico presente en *Ricinus communis*. Asimismo, se hizo énfasis en las enzimas involucradas en el proceso de la biosíntesis de este ácido graso, para postular un gen candidato a la edición genética mediante CRISPR/Cas9 que contribuya a aumentar las concentraciones de ácido ricinoleico en semillas de *R. communis*.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Diseñar una estrategia para la edición genética de *Ricinus communis* con miras a potenciar la producción de ácido ricinoleico.

2.2.2. Objetivos específicos

- a. Analizar la ruta metabólica de la biosíntesis de triacilglicerol, específicamente aquella que se encarga de la producción de ácido ricinoleico en *Ricinus communis*.
- b. Definir el gen o genes objetivos para ser editados genéticamente mediante el uso de CRISPR/Cas9 analizando las posibles secuencias PAM dentro del genoma de *R. communis* y disminuyendo al máximo la posibilidad de “off-targets”.

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

- c. Diseñar y sintetizar un vector de expresión y sgRNAs orientados a la edición genética de *Ricinus communis* mediante la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y la transfección con ribonucleoproteínas en protoplastos, respectivamente.

2.3.Marco teórico

2.3.1. Higuierilla (*Ricinus communis*)

Los cultivos de plantas oleaginosas en el mundo son bastante extensos debido a que se encuentran dentro de los cultivos de interés al tener grandes tasas de comercialización porque sus semillas tienen porcentajes altos de ácidos grasos y proteínas. Dentro de los principales cultivos se destacan canola, soya, girasol, olivo, palma, maíz, entre otros. Muchos de los aceites se emplean en alimentos como lo es el coco, aceite de palma, linaza, pero también hay otro tipo de aceites que no tienen valor dentro de la industria alimentaria, los producidos por Higuierilla son un claro ejemplo de ello, porque posee muchos usos a nivel industrial.

A nivel mundial, entre las diferentes variedades de *R. communis* disponibles, se ha estimado que el 46-55% del peso de las semillas, es aceite (Ogunniyi 2006). De ese porcentaje de aceite, el 89.15% es ácido ricinoleico (Berman, Nizri, and Wiesman 2011b). Otros ácidos grasos allí presentes son: 4.2% ácido linoleico, 3% ácido oleico, 1% ácido esteárico, 1% ácido palmítico, 0.7% ácido dihi- droxiestearico, y 0.3% ácido eicosanoico (Ogunniyi 2006). Con el foco puesto en el alto nivel de producción natural de aceite *R. communis* y, por ende, del ácido ricinoleico, la industria ha catalogado a esta planta de gran interés para la producción de aceite de ricino como materia prima para muchos procesos y productos industriales.

Ricinus communis, Higuierilla, Castor Bean como se le conoce en inglés, es miembro de la familia Euphorbiaceae, la cual se cree que es originaria de África, especialmente de Etiopía (Perry 1943). Es el mayor cultivo no comestible de oleaginosas en la región tropical, subtropical y ambientes templados del mundo por su alto contenido en aceites. Higuierilla posee características únicas a nivel físico y químico, el aceite de las semillas de higuierilla es usado como materia prima para varios productos en la industria, como lubricantes de alta calidad para aviones, alternativa a los lubricantes/aditivos contaminantes a base de azufre en el petróleo Diesel, pinturas, recubrimientos, pulimentos, tintes textiles, surfactantes, resinas, plásticos, ceras, jabones, medicamentos, cosméticos, perfumes, etc. La singularidad del aceite de ricino es que es rico (80–85%) en ácido ricinoleico un ácido graso hidroxílico (Sujatha, Reddy, and Mahasi 2008b). También, el aceite de higuierilla es el único aceite vegetal que es soluble en alcohol a temperatura ambiente, presenta alta viscosidad y requiere menor calor comparado con otros aceites durante la producción de

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

biodiesel (Jeong and Park 2009), además de las aplicaciones industriales, las hojas frescas de higuerilla se usan para alimentar gusanos de seda, las hojas secas se emplean como insecticida. Los cultivos de higuerilla juegan un papel muy importante en la economía de las regiones áridas y semiáridas del mundo, ya que esta planta tiene la capacidad de crecer en condiciones de tierras secas (Vanaja et al. 2018)

A nivel de producción, los países que reportan mayores cultivos de Higuerilla son India, China, Brasil, Mozambique, Etiopia, Paraguay y Tailandia. Particularmente, India es el país que lidera la producción de semillas de higuerilla, con un 88% de toda la producción a nivel mundial (FAO, 2013).

Uno de los principales usos del ácido ricinoleico es ser usado como materia prima para la producción de Nylon-11 el cual es resistente a solventes orgánicos a alta temperatura. Esta propiedad hace al Nylon 11 un polímero altamente deseable para la industria que fabrica tubos empleados para transportar fluidos hidráulicos en motores de automóviles. Más de 50.000 toneladas de ácido ricinoleico es usado anualmente para la producción de este Nylon (Ogunniyi 2006)

El genoma de Higuerilla está distribuido en 10 cromosomas y según estimaciones por citometría de flujo es de aproximadamente 320 Mb (Roberts et al. 1985). Para el momento, no existe un mapa genético y la información genética de higuerilla es limitada; Chan y colaboradores en el 2010 (Chan, Crabtree, Zhao, Lorenzi, Orvis, Puiu, Melake-Berhan, Jones, Redman, Chen, Cahoon, Gedil, Stanke, Haas, Wortman, Fraser-Liggett, Ravel, and Rabinowicz 2010) generaron un borrador de la secuencia del genoma de higuerilla, donde produjeron aproximadamente 2.1 millones de reads de alta calidad, y emplearon el ensamblador Celera para construir las secuencias consenso que fueron unidos y formaron 25800 scaffolds. El ensamblaje generó una cobertura de ~4.6x abarcando 350 Mb. Para el caso de los genes que codifican proteínas, ellos emplearon una predicción multi génica y realizaron una búsqueda por homología, en bases de datos. Los investigadores identificaron 31237 modelos de genes, para los cuales el 58.5% se agrupaban en 3020 familias proteicas.

2.3.2. Biosíntesis de triacilglicerol en *Ricinus communis*

Los aceites vegetales provienen principalmente de las semillas o frutos de ciertos cultivos, son empleados usualmente para alimentación y a nivel industrial. La composición de estos aceites es en gran medida triacilglicerol (TAG) y algunos elementos trazas como componentes orgánicos (esteroides, antioxidantes, entre otros). Los ácidos grasos que poseen la mayoría de las plantas son empleados como una importante reserva energética, adicionalmente, están implicados en procesos metabólicos de la planta, componentes estructurales de membranas y precursores de moléculas

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

señalizadoras que se ven involucradas en procesos de desarrollo y respuesta a estrés (Harwood 1996; Weber 2002)

Triacilglicerol (TAGs) es una de las formas de almacenar lípidos en los organismos, de forma particular, los TAGs sirven como una reserva energética en semillas de plantas, esto contribuye a la germinación y al desarrollo de plántulas; también estos ácidos grasos son empleados en la industria alimentaria por su alto contenido nutricional y para propósitos industriales. En el caso de *R. communis*, sus TAGs son demandados por diversos tipos de industrias debido a que el ácido ricinoleico [12-hydroxy-oleate] posee un grupo -OH responsable de propiedades físicas y químicas únicas. Desde una mirada a nivel industrial, es deseable tener TAGs enriquecidos con un ácido graso específico para así poder ser usado directamente después de la hidrólisis, saltándose el paso del fraccionamiento de las especies de ácidos grasos de manera individual (Brown et al. 2012)

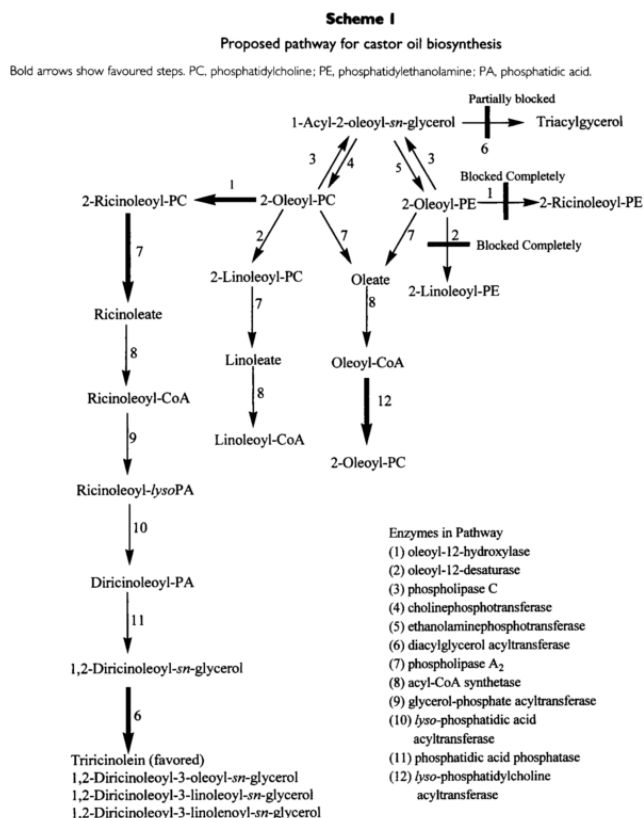
El ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxyoctadec-*cis*-9-enoico; 18:1 -OH) es el mayor ácido graso en las semillas de *Ricinus communis* donde constituye hasta el 90% de los ácidos grasos encontrados en los TAGs. (Brown et al. 2012)

La biosíntesis de TAGs en *R. communis* ocurre en los plastidios y se exporta al citoplasma. El ácido oleico es activado a oleoyl-CoA en el citoplasma e importado al retículo endoplasmático con la ayuda de la coenzima A (CoA), allí se somete a un proceso de hidroxylación, por medio de la actividad de la enzima oleato hidroxilasa (FAH12) produciendo ácido ricinoleico (C18:1 -OH) que es incorporado a un esqueleto de glicerol por medio de reacciones de acilación, generando TAGs (Martine Miquel and Browse 1992).

Es así como en el año 2000, McKeon y colaboradores (McKeon, Chen, and Lin 2000) propusieron un esquema donde se muestra como es el proceso de incorporación de ácido ricinoleico a triacilglicerol, aquí se incluye liso-fosfatidilcolina aciltransferasa (LPCAT), que transfiere oleato de oleoil-CoA a la posición *sn*-2 de la fosfatidilcolina (PC) para el proceso de hidroxilación, como se ha mencionado, FADH12 hidroxila al *sn*-2 oleato para formar *sn*-2 ricinoleoyl-PC para hidrólisis, la fosfolipasa A₂ elimina el ácido ricinoleico de la posición *sn*-2 y libera liso-PC para ser reincorporado a oleato por la enzima LPCAT, finalmente la diacilglicerolaciltransferasa (DAGAT) incorpora preferencialmente ricinoleato para formar diricinoleins y triricinolein. (Figura 22). Se ha mostrado que *sn*-2 oleoyl-PC es el sustrato para FAH12 pero también para 2-linoleoyl-PC que genera ácido linoleico mediante la acción de oleoyl-12-desaturasa (FAD2), por lo cual se ha visto de manera premonitoria que afectar la actividad de ésta enzima podría aumentar la producción de ácido ricinoleico, esto resulta bastante interesante cuando se vincula la acción de la FAD2 en otros procesos metabólicos de la planta.

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

Figura 22. Esquema presentado por McKeon, Chen, and Lin 2000 para la biosíntesis del ácido ricinoleico en *Ricinus communis*.



El Oleoyl-ACP se sintetiza en primera instancia en los plastidios, luego es hidrolizado para formar ácido oleico por la enzima oleoyl-ACP tioesterasa (ATT), y finalmente pasa a ser oleoyl-CoA por la acción de la acyl-CoA sintetasa (ACS). Oleoyl-CoA se transporta a un pool de acyl y es usado como materia prima para el ricinoleato. Oleoyl-CoA ingresa al retículo endoplasmático, donde la lisofosfatidilcolina aciltransferasa (LPCAT) transfiere el grupo oleoyl al sitio 2-sn de la fosfatidilcolina (PC) como sustrato para la oleoyl.12. hidroxilasa (FAH12), la cual cataliza la conversión de 2-oleoyl-PC a 2-ricinoleoyl-PC. La fosfolipasa A₂ (PLA₂) libera simultáneamente ricinoleato y lisofosfatidilcolina (LPC) a partir de 2-ricinoleoyl-PC. LPC puede formar nuevamente sn-2-oleoyl-PC como sustrato para FAH12, esta reacción la lleva a cabo LPCAT. El ricinoleato se convierte en ricinoleoyl-CoA por la lipoyl-CoA sintetasa de cadena larga (LACS), la cual actúa como un donante de acyl que ingresa a la ruta dependiente de acyl-CoA y finalmente triacilglicerol (TAG) es formado por las reacciones de acilación. El glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) en un principio forma ricinoleyl-lysoPA. El ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAAT) la segunda enzima aciltransferasa cataliza la acilación del sitio LPA para producir ácido fosfatídico (PA). La PA se fosforila mediante la fosfatasa ácida fosfatídica (PAP) para producir diacilglicerol (DAG). La tercera aciltransferasa implicada en el proceso de

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

biosíntesis de TAG, es la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), esta enzima cataliza la acilación del sitio 3-sn del DAG para formar TAG. Las enzimas clave durante la ruta biosintética del ácido ricinoleico, son la acyl-ACP tioesterasa, lisofosfatidilcolina aciltransferasa, oleoyl-12-hidroxilasa, fosfolipasa A2, diacilglicerolaciltransferasa (L. Wang et al. 2019a)

Wang y colaboradores, en el 2019, (L. Wang et al. 2019a) realizaron un estudio para la identificación de genes expresados diferencialmente durante la biosíntesis del ácido ricinoleico, a su vez emplearon una validación en una transcripción reversa en PCR cuantitativa en tiempo real. La ruta biosintética para el ácido ricinoleico ha sido establecida por J.-T. Lin and Arcinas 2007 y T. McKeon, *et al* 2000, allí se comprobó que la producción de ricinoleato está totalmente ligado a procesos de regulación específica de sustratos de las enzimas implicadas durante este proceso. Para este estudio se comprobaron las siguientes enzimas implicadas durante el proceso de biosíntesis, que se esquematizan en la Figura 23.

Fatty acyl-ACP thioesterase B (ATT)

Oleoyl-12-Hydroxylase FAH12

Diacylglycerol acyltransferase DGAT

Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase PDAT

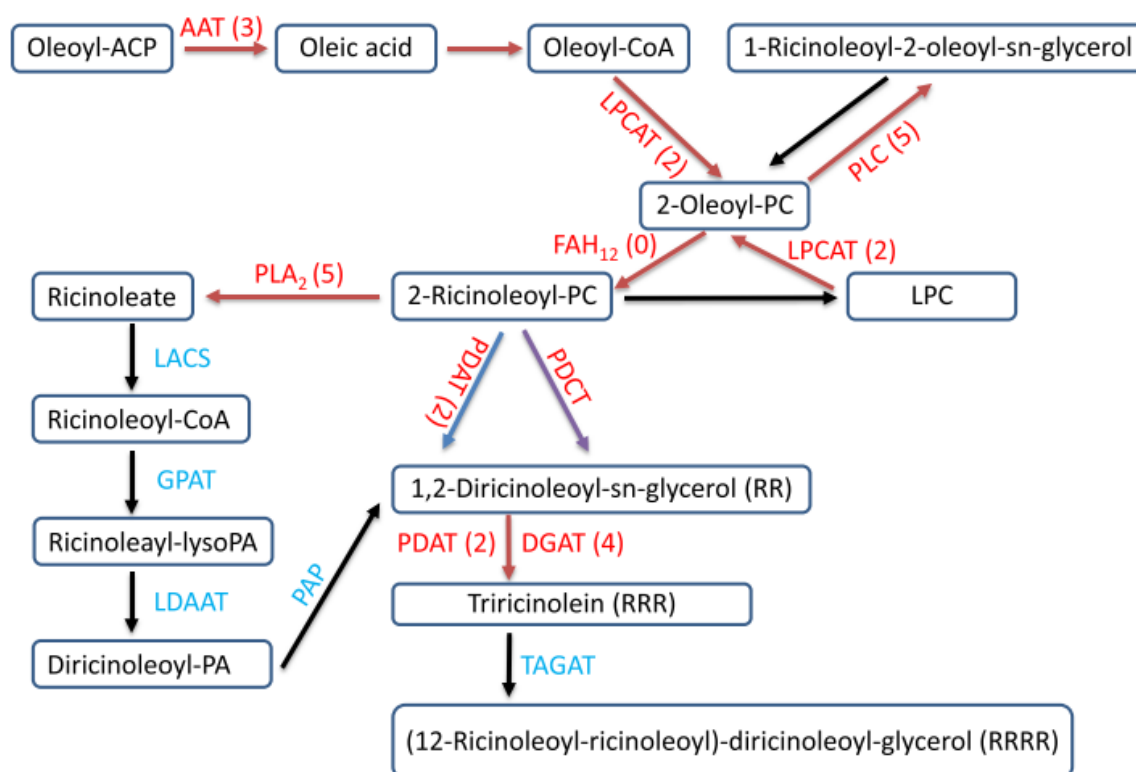
Phospholipase A2 activity PLA2

Phospholipase C PLC2

Lysophosphatidylcholine acyltransferase LPCAT

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

Figura 23. Expresión diferencial de genes que codifican las enzimas clave para la biosíntesis del ácido ricinoleico en *Ricinus communis*. Tomada de Wang et al. 2019.



Dos tipos de reacciones metabólicas podrían reducir los niveles de ácido ricinoleico en las semillas de Higuierilla. La primera consiste en una competencia por el pool de ácido oleico por parte de la enzima oleato desaturasa, y la segunda por una reacción adicional de elongación del 18:1 -OH por desaturasas adicionales para dar productos como el 18:2 -OH y 20:1 -OH (Mark A. Smith et al. 2003).

Existe una regulación diferencial de los genes FAH12 y FAD2 durante el desarrollo de la semilla, la expresión de FAD2 disminuye 6 veces en el estado V/VI de desarrollo de la semilla cuando se compara con los estados iniciales donde solo decrece 2 veces. Si se es consistente con este tipo de control transcripcional a nivel de actividad enzimática habría una menos competencia entre las reacciones de hidroxilación y desaturación en los estadios tardíos del endospermo. (Brown et al. 2012)

El gen de la hidroxilasa del ácido oleico (FAH12), el cual produce el ácido ricinoleico a partir de la oleoyl-fosfatidilcolina, probablemente evolucionó a partir del gen que codifica la desaturasa del

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

ácido oleico (FAD2). Este par de enzimas compiten por la esterificación del ácido oleico en la posición *sn*-2 de la fosfatidilcolina (PC), el que representa el principal sustrato para ambas (Schmidt et al. 1994), y los productos acilo resultantes son modificados subsecuentemente o transferidos para formar triacilglicerol (TAGs) (Bafor et al. 1991; Richards, Taylor, and Murphy 1993). FAD2 cataliza la inserción dependiente de O₂ del doble enlace *cis*- Δ 12 en el ácido oleico (18:1 Δ 9) para producir ácido linoleico (18:2 Δ 9,12), usando el citocromo b5 y NADH como co-factor (Kearns, Hugly, and Somerville 1991; M. A. Smith et al. 1992). En higuera, el ácido ricinoleico es sintetizado por FAH12 la cual cataliza la reacción a partir de la 2-oleoyl-PC a 2-ricinoleoyl-PC (Moreau and Stumpf 1981) empleando los mismos cofactores de la FAD2. Las enzimas FAD2 y FAH12 son proteínas integrales de membrana y se encuentran en el retículo endoplasmático y comparten un origen filogenético debido a su alta identidad global en su secuencia de aminoácidos (F. J. van de Loo et al. 1995)

2.3.3. Enzimas desaturasas de ácidos grasos

Las plantas tienen varias enzimas desaturasas de ácidos grasos, las cuales hacen procesos de desaturación en los glicerolípidos de los tejidos. Estas enzimas se encuentran principalmente de manera soluble, en los cloroplastos o unidas a membrana en el retículo endoplasmático. Existen 3 clases principales de estas enzimas, las primeras se agrupan en acyl-CoA desaturasas que se encuentran asociadas a la membrana del retículo endoplasmático, animales, levaduras y hongos; éstas insertan insaturaciones en los ésteres CoA del ácido graso. Δ 9 desaturasa sintetiza ácido oleico que se usa en se encuentran normalmente en la síntesis de fosfolípidos y ésteres de colesterol, Δ 6 y Δ 5 desaturasas son empleadas para la síntesis ácidos grasos altamente insaturados (siglas en inglés HUFAs), que son principalmente esterificados en fosfolípidos y ayudan a mantener la fluidez de la membrana (Nakamura and Nara 2004).

La segunda clase son las acyl-lipid desaturasas, están unidas a membrana y se encuentran en cianobacterias y cloroplastos. Éstas introducen doble enlace en la cadena del acyl graso de glicerolípidos polares y usan la ferredoxina como donante de electrones. Las acyl lipid desaturasas Δ 3, Δ 6, Δ 9 y Δ 12 se han caracterizado y son especificadas por el doble enlace que se inserta cerca al terminal carboxil o metil del ácido graso.

La tercera clase son las desaturasas solubles, como lo es la acyl-ACP, presente en el estroma del plastidio de las plantas, utiliza ferredoxina como donador de electrones. Estas enzimas incorporan doble enlace en ácidos grasos que están esterificados con la proteína transportadora ACP, un ejemplo es la desaturasa Δ 9 acyl-ACP la cual cataliza la desaturación del ácido esteárico a ácido oleico en el estroma de los cloroplastos. Esta desaturasa convierte de manera predominante ácidos grasos saturados a ácidos grasos insaturados en aceites vegetales (Slabas and Fawcett 1992).

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

Las desaturasas $\Delta 12$ y $\Delta 15$ unidas a membrana en el retículo endoplasmático convierten oleato en ácido linoleico y linoleato, respectivamente. En particular, la oleate $\Delta 12$ desaturasa (FAD2) es una proteína hidrofóbica transmembranal en el retículo endoplasmático, su mecanismo de acción es sobre los ácidos grasos, inserta un doble enlace *cis* entre las posiciones C12 y C13 del ácido oleico monosaturado, generando el ácido linoleico poliinsaturado (Stoutjesdijk et al. 2002). La enzima FAD2 desarrolla un rol clave en varios procesos que involucran biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados en tejidos no fotosintéticos como lo son raíces y desarrollo de semillas en plantas oleaginosas.

2.3.4. Biosíntesis de linoleato como precursor para otras rutas biosintéticas en plantas

Por otro lado, cuando nos remitimos a observar la ruta biosintética de ácido linoleico en plantas (Figura 24) podemos observar que este ácido graso se encuentra usualmente como linoleoyl-CoA o se incorpora en un lípido. Cuando está de la forma linoleoyl-CoA, este se asocia con la biosíntesis de estigmas, específicamente con la biosíntesis de un exudado estigmático que juega un papel clave en el proceso de polinización.

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

Figura 24. Esquema elaborado con el software MetaCyc (Caspi et al. 2014) para la biosíntesis del ácido linoleico en *Arabidopsis thaliana*.



La forma del linoleato asociado a un glicerolípido se vincula con la biosíntesis de γ -linolenato en plantas y algas rojas y de γ -linolenato en plantas. El primero que se conoce usualmente como ácido linolénico es un ácido graso poliinsaturado (18:3) que al igual que el ácido linoleico, es un constituyente importante de las membranas células de plantas. El γ -linolenato es un ácido graso poliinsaturado (18:3) que a su vez es precursor de la biosíntesis del ácido araquidónico. Sin embargo, existen unas desaturasas alojadas en el cloroplasto, que son la FADC y FADD que han mostrado que su actividad desaturasa opera sobre 18:1 sintetizando 18:2 que componen en su mayoría las membranas de los cloroplastos, además sintetizan 18:3 que según se ha reportado, se exporta a las membranas extracloroplasto como las de las células de la hoja (M. Miquel and Browse 1992).

2.4. Materiales y métodos

2.4.1. Análisis de rutas metabólicas

Un estudio de análisis de las rutas metabólicas para *R. communis* fue realizado por investigadores del grupo Ciencias Biológicas y Bioprocesos (CIBIOP), en el que, por un lado, se tomaron datos de RNA-seq depositados en la base de datos SRA del NCBI con el código ERA047687 que está asociado al proyecto “Tissue-specific Whole Transcriptome Sequencing in Castor bean Directed at Understanding Triacylglycerol Lipid Biosynthetic Pathways”, y por otro lado, se generaron librerías transcriptómicas propias, usando mRNA de flores masculinas en desarrollo (Accesion: ERX021379), hoja (Accesion: ERX021378), semilla en germinación (Accesion: ERX021377), endospermo en desarrollo (Accesion: ERX021376, ERX021375) (Rodríguez, et. al 2020)

Se mapearon los datos de RNA-seq en el programa Tophat2. La anotación de los genes se basó en la comparación de los datos obtenidos de RNA-seq durante esa investigación con la base de datos del genoma de *Ricinus communis* del TIGR. El conteo de lecturas por gen se realizó utilizando el programa Cufflinks y finalmente el programa cuffdiff fue usado para calcular los valores de expresión diferencial de los genes (Rodríguez, et. al 2020).

En el programa OrtoMCL se realizó el análisis de ortología para a par con respecto a proteínas de *Arabidopsis thaliana* tomadas de la base de datos del genoma de esta última (<https://www.arabidopsis.org/>). La red de interacción de proteínas se realizó mapeando las proteínas ortólogas sobre la red reportada en *Arabidopsis* (Rodríguez, et. al 2020).

2.4.2. Búsqueda de secuencias candidatas del gen FAD2 para el diseño de sgRNA

La obtención de los sgRNA candidatos para realizar la edición genética en el gen FAD2 de *R. communis* se realizó mediante un análisis de redes de interacción proteína-proteína y expresión genética diferencial en varias variedades de Higuierilla y en diferentes estadios de desarrollo (Rodríguez, et. al 2020), con base a esos resultados, se identificó *in silico* los genes clave implicados en la síntesis y acumulación del ácido ricinoleico y la expresión de otros genes implicados en la síntesis de otros ácidos grasos. En primer lugar, se resaltó la importancia del gen FAH12 implicado en la ruta metabólica para la síntesis de ácido ricinoleico, en segunda instancia, se identificó que la expresión del gen FAD2 era el gen que se expresaba en mayor proporción después del FAH12. El diseño de los sgRNA implicó secuenciar el gen FAD2, alinearla con la secuencia del Castor Bean Genome Project y los polimorfismos encontrados en la secuencia fueron tomados en cuenta para el diseño y selección de los sgRNA que estarían dirigidos al FAD2 (Rodríguez, et. al 2020)

2.4.3. Desarrollo de sgRNA y vector de expresión

A partir del genoma secuenciado y anotado de Higuierilla (Chan, Crabtree, Zhao, Lorenzi, Orvis, Puiu, Melake-Berhan, Jones, Redman, Chen, Cahoon, Gedil, Stanke, Haas, Wortman, Fraser-Liggett, Ravel, Rabinowicz, et al. 2010), y reportado en el GenBank (accession numbers AASG02000001- NW_002994277), se realizó el diseño de sgRNA orientado al gen FAD2 (accession number NM_001323719.1), ubicando las posibles secuencias PAM dentro del genoma, y así obtener a precisión las secuencias candidatas para la edición genética y así mismo, disminuir la posibilidad de “*off target*” (cortes inespecíficos) en el ensayo. Para ello, se usaron plataformas “on line” disponibles al público, como E-Crispr (Naito et al. 2015b) y CrisprDirect (Heigwer, Kerr, and Boutros 2014).

Para la elaboración del vector de expresión, que contendría la secuencia del sgRNA y la secuencia para la expresión de la CAS9, se contrató un servicio de “Custom Plant CRISPR” con la compañía Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). El diseño elaborado en esta investigación buscó incluir en el vector: un casete de expresión génica con un promotor del virus del mosaico de la coliflor (Camv35S-promoter), adicionalmente, el vector debió contener una región target donde se ubica la secuencia del sgRNA diseñado, la secuencia que codifica para la endonucleasa Cas9, el gen de resistencia para la selección en planta de Higromicina y Kanamicina para selección en bacteria. Así mismo se buscó incluir 6 sitios de corte con enzimas de restricción (XbaI, EcoRI, HindIII, NheI, StuI, XhoI), para facilitar la posterior caracterización molecular del vector (independiente) y del ADN extraído de las plantas transformadas con el mismo. EcoRI y HindIII tienen su sitio de corte entre el promotor AtU6 y la región target del sgRNA, NheI y StuI flanquean la zona que codifica para la Cas9 Y XbaI y XhoI cortan entre el borde izquierdo y derecho.

2.5. Resultados

2.5.1. Análisis de rutas metabólicas.

Se generó una red de 11.706 proteínas de *Arabidopsis thaliana*, con 24.417 interacciones entre las mismas. El programa OrtoMCL identificó 11.192 proteínas de *R. communis* con homología a las proteínas de *A. thaliana*, con 23.777 interacciones entre las proteínas.

A partir del resultado de red de interacción de proteínas, se determinaron las proteínas implicadas con la ruta de biosíntesis, modificación y acumulación de ácidos grasos, lo que permitió determinar que la proteína oleato-12 hidroxilasa (FAH12) (ID genoma 28035.m000362, E.C. 1.14.18.4) se expresó 10.77 veces más en los estados avanzados de desarrollo de la semilla en comparación a otros tejidos. La FAH12 es clave para la producción de ácido ricinoleico debido a que metaboliza el paso de la 2-oleoil fosfatidilcolina a ricinoleic oil fosfatidilcolina en Higuierilla. Además, se identificaron otras proteínas que se expresaban con alta frecuencia después de la FAH12 como lo es la oleato 12-desaturasa (FAD2), Diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) y

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT1-2), las cuales están involucradas no solo con la biosíntesis de ácidos grasos sino también con la acumulación de los mismos.

2.5.2. Desarrollo bioinformático de vectores y sgRNA.

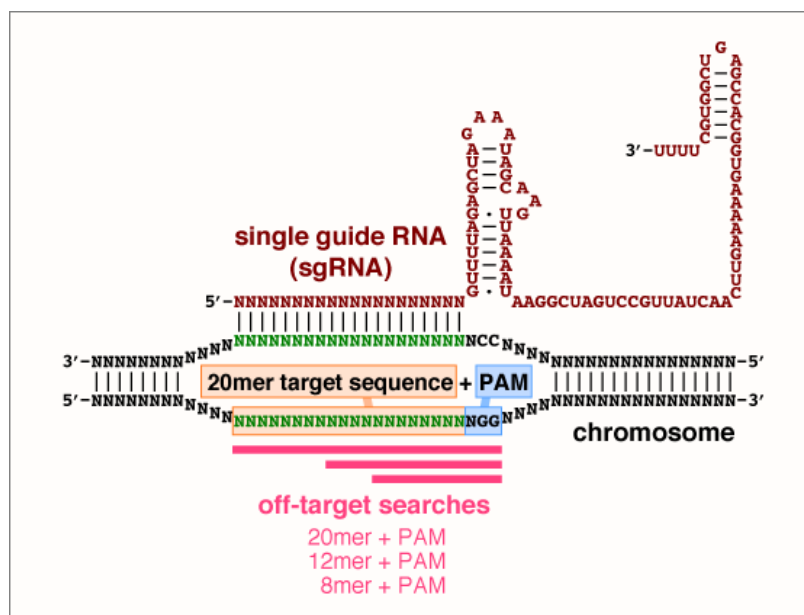
Para la identificación y el diseño de los sgRNA dirigidos al gen FAD2 de *R. communis*, se empleó la plataforma CrisprDirect (Naito et al. 2015a), el cual es un servidor web simple y funcional para seleccionar *targets* a partir de una secuencia ingresada. El servidor web acepta números de acceso o secuencias de nucleótidos de hasta 10 kbp como entrada y entrega una lista de targets CRISPR/Cas candidatos. Las secuencias de estos posibles targets son de 20 nucleótidos con la secuencia PAM adyacente que es NGG o NRG. El resultado que suministra (ver Figura 25) la página brinda información sobre posición de la secuencia target, secuencia, contenido de GC y temperatura de melting (Tm), con respecto al contenido de GC, si este es muy alto o bajo el sgRNA es menos efectivo para hibridarse a la secuencia target (T. Wang et al. 2014)

Al momento de diseñar los sgRNAs para el gen de interés (FAD2), se ingresó el genoma de *Ricinus communis* (Npúmero acceso Genbank: AASG02000000) para poder diseñar tales RNAs guías. En la figura 25, se aprecia los resultados de las dos mejores opciones de secuencias que se pueden emplear como sgRNA para ser direccionados al gen FAD2 de *R. communis*

Figura 25. Visualización de resultados de la búsqueda de sgRNA para el gen FAD2 de *Ricinus communis* en la plataforma CrisprDirect

position		target sequence	sequence information				number of target sites ?		
start - end	▲ + - ▼	20mer+ PAM (total 23mer)	GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer	restriction sites	20mer +PAM	12mer +PAM	8mer +PAM
224 - 246	+	TCAAAGCGCCATTACCCCT TGG [gRNA]	55.00 %	76.97 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	205 [detail]
172 - 194	+	TCCTCCTCCATCTAAGAAAG TGG [gRNA]	45.00 %	69.47 °C	-		1 [detail]	2 [detail]	1218 [detail]

La búsqueda de Off-targets se hizo contra la secuencia genómica. En el análisis desarrollado, se identificó el número de sitios donde ocurre un match perfecto, este sitio está dentro o fuera del objetivo, el caso ideal es un número más pequeño después del cero. El número en la primera columna (20 mer + PAM) indica el número de matchs en contra del genoma, si es uno (1) apunta a que solo existe una única coincidencia perfecta de esa secuencia en el genoma. En la segunda columna (12mer + PAM) desde la región 3' de la secuencia adyacente a la región PAM es para observar cuantas opciones de match existen solo considerando 12 pb de la secuencia, es particularmente importante esta región debido a que contiene los residuos más críticos que determinan la especificidad del target., finalmente, la columna que corresponde a 8mer + PAM muestra el número de marches que pueden ocurrir si solo se consideran los 8 pb adyacentes de la región PAM. Por lo tanto, cuando tenemos valores de 1 en las dos primeras columnas, nos está indicando una alta especificidad del target (ver Figura 26).

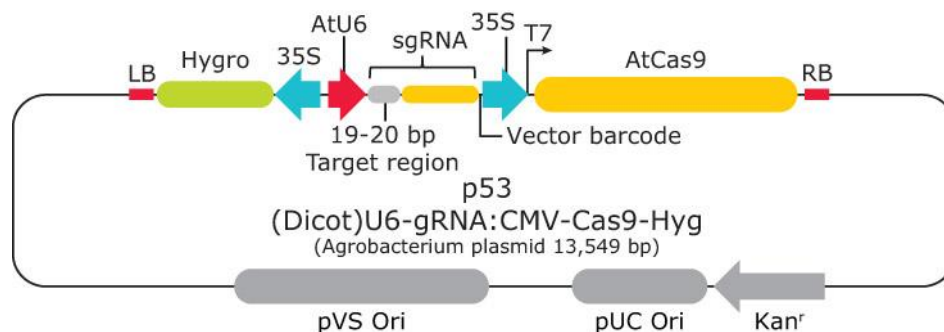
Figura 26. Representación gráfica de la búsqueda de off-targets suministrada por la plataforma CrisprDirect

El diseño del vector de expresión de CRISPR/Cas9 para plantas, estuvo apoyado en el servicio “Custom Plant CRISPR” con la compañía Sigma-Aldrich. Dos opciones de sgRNA para el gen FAD2 fueron solicitadas sintetizar y clonar en el vector.

Para la clonación, se utilizó el esqueleto del plásmido CRISPRPL (figura 26) que contiene una región que codifica para el gen de resistencia a Higromicina, 35S (promotor para el marcador de selección en planta), AtU6 el promotor de la RNA polimerasa III provee una poderosa capacidad de transcribir sgRNA en plantas dicotiledóneas (Lin et al 2007), 35S, T7 AtCas9 (*Arabidopsis thaliana* codon-optimized Cas9), resistencia a Kanamicina, pUC Ori, pVS Ori (Tiene dos orígenes de replicación, el primero es para *E. coli* para asegurar mayor número de copias, el segundo sirve para replicación y estabilidad del plásmido en *Agrobacterium tumefaciens*).

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

Figura 27. Representación gráfica del vector de expresión CRISPRPL que se utilizará en la transformación mediada por *Agrobacterium* en explantes de *R. communis* (Ver capítulo 3)



Después de la búsqueda de las dos mejores opciones de sgRNA para realizar la edición genética en el gen FAD2, se nombraron de la siguiente manera

CRISPR 79 CAAAGCCGCCATTCACCCTTGG

CRISPR 27 CCTCCTCCATCTAAGAAAGTGG

Figura 28. Kit CRISPRRevolution DE LA COMPAÑÍA Synthego. De izquierda a derecha, sgRNA para la secuencia CRISPR 27, sgRNA para la secuencia CRISPR 79, vial con 15 µl de la nucleasa Cas9, agua libre de nucleasas y 1x Buffer TE.



Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

La compañía Synthego (California, <https://www.synthego.com/>) sintetizó los sgRNA y la Cas9 para realizar el ensamble de ribonucleoproteína (capítulo 3). El kit CRISPRRevolution contaba con dos viales con las dos opciones de sgRNA los cuales llegaron a una liofilizados, estos se diluyeron con 15 µl de 1x TE buffer para quedar a una concentración final de 100 µM (1.5 nmol). La proteína Cas9 llegó en un vial a una concentración de 300 pmol y diluida en un buffer que contenía 10mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1mM EDTA, 50% Glycerol (pH 7.4 at 25°C) . Después de diluir los sgRNA, éstos al igual que la Cas9 se almacenarán a -20°C hasta su uso.

Figura 29. Representación de los dos sitios de edición con su respectiva secuencia para el gen FAD2 de *Ricinus communis*.

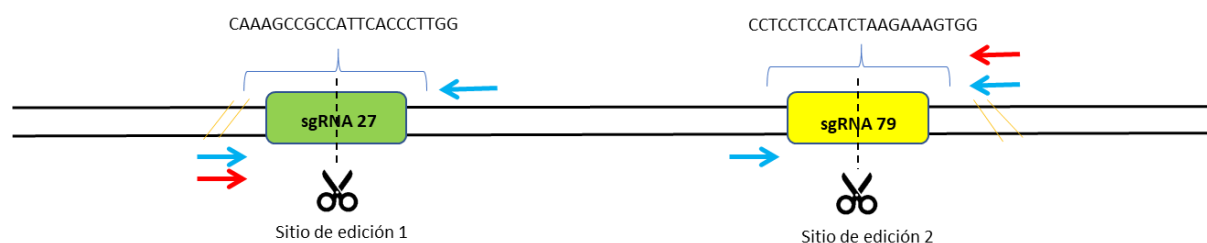
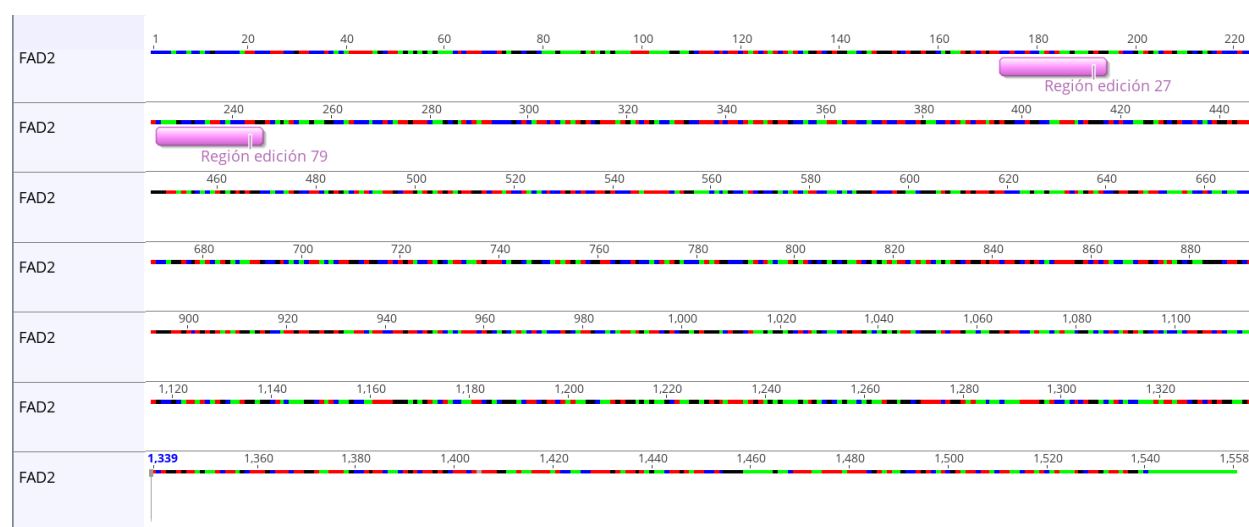
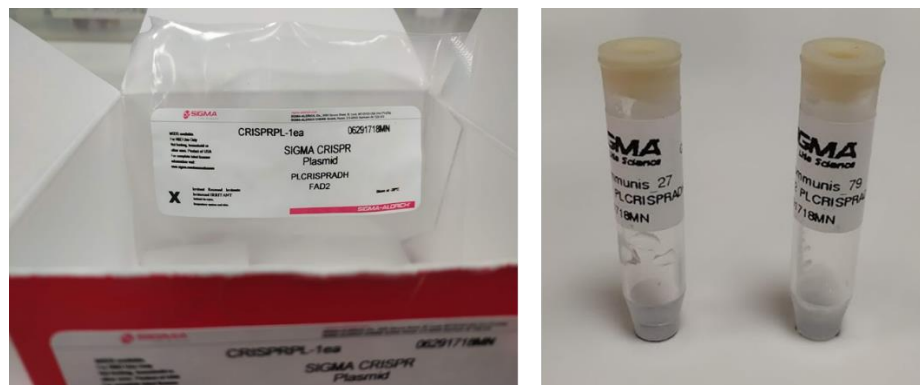


Figura 30. Ubicación de los dos sgRNA en la secuencia del gen FAD de *Ricinus communis*.



Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

Figura 31. Kit de SIGMA-ALDRICH que contiene los dos viales de los plásmidos. Cada uno con la secuencia particular de sgRNA.



Los viales de los vectores con las dos opciones de sgRNA propuestos, se prepararon a una concentración de 20 ng/μl en un volumen de 50 μl. Estos se dejaron almacenados a -20°C hasta su uso.

2.6.Discusión

Al momento de realizar la búsqueda de las proteínas que presentaban una mayor expresión en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos en las semillas de *Ricinus communis*, los análisis indicaron que la enzima FAH12 presentaba valores de expresión 10.77 veces más que otras enzimas implicadas en estas rutas de biosíntesis de ácidos grasos. Asimismo, después de la FAH12, enzimas como la FAD2, DGAT y PDAT también presentaban un grado de expresión en esta ruta metabólica.

Los estudios realizados por McKeon y colaboradores (McKeon, Chen, and Lin 2000) y por Wang y colaboradores (L. Wang et al. 2019a) concuerdan con lo hallado en el análisis presentado en este capítulo. De manera particular, en los esquemas que ellos presentaron, específicamente en el estudio de Wang que analizaron la expresión diferencial de genes que codifican las enzimas clave para la biosíntesis del ácido ricinoleico en *Ricinus communis*, las enzimas FAH12, DGAT y PDAT están totalmente implicadas en la formación de este ácido graso en semilla y la enzima FAD2 no pareciera tener un rol relevante dentro de la biosíntesis del ácido ricinoleico. La FAD2, está implicada en la biosíntesis de ácido linoleico, pero usa como precursor el ácido oleico, que es el mismo para la biosíntesis de ácido ricinoleico. Las enzimas FAD2 y FAH12 son proteínas integrales de membrana y se encuentran en el retículo endoplasmático y comparten un origen filogenético debido a su alta identidad global en su secuencia de aminoácidos (Frank J. Van De Loo et al. 1995; Broun, Boddupalli, and Somerville 1998), lo que hace que este par de enzimas

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

compitan por la esterificación del ácido oleico en la posición *sn*-2 de la fosfatidilcolina (PC), el que representa el principal sustrato para ambas, y los productos acilo resultantes son modificados subsecuentemente o transferidos para formar triacilglicerol (TAGs) (Bafar et al. 1991; Richards, Taylor, and Murphy 1993). La enzima PDAT está implicada en procesos de acumulación de ácidos grasos hidroxilados (al que pertenece el ácido ricinoleico) (van Erp et al. 2011) y la enzima DGAT cataliza la acilación del sitio 3-*sn* del DAG para formar TAG durante la formación del ácido ricinoleico (L. Wang et al. 2019b).

Lo anterior, nos permite postular a la proteína FAD2 como candidata a ser editada genéticamente, puesto que las otras dos enzimas que también presentaron niveles de expresión a en la biosíntesis de ácidos grasos en semillas (DGAT2 y PDAT1-2) son claves durante la ruta de biosíntesis del ácido ricinoleico y también están implicadas en procesos de acumulación de triacilgliceroles.

Por otro lado, al momento de diseñar las sondas de sgRNA para el gen FAD2, se encontraron dos secuencias promisorias para el objetivo, con muy buenos valores a nivel de baja probabilidad de “off-targets” tal como se visualiza en la figura 25, en donde existe únicamente una (1) probabilidad de match de los 20 nucleótidos sin la región PAM, que para ambas secuencias es TGG. En las figuras 29 y 30, donde se representa la ubicación de las dos regiones a editar en la proteína, se evidencia que ambos sitios se ubican al inicio de la proteína, esto trae una ventaja puesto que direccionar cortes en posiciones iniciales de la secuencia evitaría que una sección de la proteína se expresara y quedaran remanentes a nivel celular, como ocurriría si los sitios de edición se posicionaran en posiciones posteriores al sitio catalítico de la enzima.

El uso de Ribonucleoproteínas (RNP) con sgRNA orientados a genes específicos, ha tomado relevancia para desarrollar plantas editadas sin integración de DNA foráneo. El primer experimento que se realizó de manera exitosa con RNP fue en maíz con 64 y posteriormente se logró en trigo 66. Las especies de *Oriza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *silene latifolia*, *vitis ninfifera*, *solanum tubeosum* y *Lactuca sativa* han logrado altas tasas en eficiencia de transformación cuando se realiza transformación con RNP. (Kuluev et al. 2019).

2.7. Conclusiones

Las plantas que tienen alto contenido en ácidos grasos claramente son un objetivo para diversas industrias. El ácido ricinoleico no se excluye de tal interés, ya que se han registrado cerca de 700 usos en diversas industrias. La regulación de la enzima FAD2 sobre los procesos metabólicos de las plantas es sustancial, al generar una mutación en dicha enzima aumentaron los niveles de ácido oleico que puede ser empleado por la ruta biosintética del ácido ricinoleico para aumentar su producción y acumulación en semillas, representando un rasgo de alto interés.

El gen candidato para ser intervenido por CRISPR/Cas9 en este proyecto es el codificante de la enzima FAD2, puesto que durante el proceso de biosíntesis del ácido ricinoleico en semilla no se ve implicado, además, es el que compite directamente por el pool de ácido oleico con la enzima FAH12, es por eso, que al generar una mutación en FAD2, se estaría dejando, en teoría, mayor disponibilidad de ácido oleico a la enzima FAH12 para aumentar la producción de ácido ricinoleico.

Con respecto a los objetivos de este capítulo, se cumplió a cabalidad con el diseño de secuencias candidatas para elaborar dos opciones de sgRNA con el objetivo de mutar el gen FAD2, estas dos opciones (CRISPR 27 y CRISPR 79) lograron encajar muy bien para el diseño de las dos metodologías para la edición de *R. communis*. En una primera instancia se diseñaron los dos vectores de expresión donde cada uno contenía la secuencia de sgRNA a evaluar, y en un segundo momento se logró sintetizar los sgRNA de manera individual para realizar el ensamble con la CAS9 y formar un complejo ribonucleoproteico. Los resultados de este segundo capítulo fueron vitales para poder realizar los experimentos capítulo No 3, el cual fusiona las técnicas del cultivo *in vitro* del primer capítulo con los vectores de expresión y ribonucleoproteínas diseñados y sintetizados en este capítulo.

2.8.Referencias

- A. Sarvesh, D.M. Ram Rao, T.P. Reddy. 1992. “Callus Initiation and Plantlet Regeneration from Epicotyl and Cotyledonary Explants of Castor (*Ricinus Communis* L.).” *Adv. Plant Sci.* 5: 124–28.
- Agari, Yoshihiro, Seiki Kuramitsu, and Akeo Shinkai. 2010. “Identification of Novel Genes Regulated by the Oxidative Stress-Responsive Transcriptional Activator SdrP in *Thermus Thermophilus* HB8.” *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02133.x>.
- Ahn, Yeh-Jin, Louisa Vang, Thomas A McKeon, and Grace Q Chen. 2007. “High-Frequency Plant Regeneration through Adventitious Shoot Formation in Castor (*Ricinus Communis* L.).” *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant* 43 (1): 9–15. <http://www.jstor.org/stable/20461638>.
- Aishwariya, V, Ravindra Ramrao, E Kokila, L Arul, D Sudhakar, and K K Kumar. 2015. “IMPACT OF TDZ (THIDIAZURON) PULSE TREATMENT IN SINGLE AND MULTIPLE SHOOT FORMATION IN CALLI OF JATROPHA CURCAS L . [II] MATERIALS AND METHODS [III] RESULTS” 3 (3): 879–84.
- Alonso, José M., Anna N. Stepanova, Thomas J. Leisse, Christopher J. Kim, Huaming Chen, Paul Shinn, Denise K. Stevenson, et al. 2003. “Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis Thaliana*.” *Science* 301 (5633): 653–57. <https://doi.org/10.1126/science.1086391>.
- Amin, Noor A L, Naveed Ahmad, W U Nan, F U Xiuming, Wang Nan, B O Xiaoxue, M A Tong, and Wang Piwu. 2018. “AN EFFICIENT TRANSIENT ASSAY FOR CRISPR CAS9 SYSTEM DELIVERING TARGETED MUTATION USING SYNTHETIC OLIGO SgRNA IN SOYBEAN (GLYCINE AN EFFICIENT TRANSIENT ASSAY FOR CRISPR CAS9 SYSTEM DELIVERING TARGETED MUTATION USING SYNTHETIC OLIGO SgRNA IN SOYBEAN (GLY,” no. July.
- Amoo, Stephen O., Jeffrey F. Finnie, and Johannes van Staden. 2011. “The Role of Meta-Topolins in Alleviating Micropropagation Problems.” *Plant Growth Regulation* 63 (2): 197–206. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9504-7>.
- Anand, Ajith, Steven H Bass, Emily Wu, Ning Wang, Kevin E McBride, Narayana Annaluru, Michael Miller, Mo Hua, and Todd J Jones. 2018. “An Improved Ternary Vector System for *Agrobacterium*-Mediated Rapid Maize Transformation.” *Plant Molecular Biology* 97 (1–2): 187–200. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0732-y>.

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

- Anand, Ajith, Srinivasa Rao Uppalapati, Choong Min Ryu, Stacy N. Allen, Li Kang, Yuhong Tang, and Kirankumar S. Mysore. 2008. "Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance Play a Role in Attenuating Crown Gall Disease Caused by *Agrobacterium Tumefaciens*." *Plant Physiology* 146 (2): 703–15. <https://doi.org/10.1104/pp.107.111302>.
- Andersson, Anders F., and Jillian F. Banfield. 2008. "Virus Population Dynamics and Acquired Virus Resistance in Natural Microbial Communities." *Science* 320 (5879): 1047–50. <https://doi.org/10.1126/science.1157358>.
- Aremu, Adeyemi O., Michael W. Bairu, Karel Doležal, Jeffrey F. Finnie, and Johannes Van Staden. 2012. "Topolins: A Panacea to Plant Tissue Culture Challenges?" *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0007-7>.
- Bafor, M, M a Smith, L Jonsson, K Stobart, and S Stymne. 1991. "Ricinoleic Acid Biosynthesis and Triacylglycerol Assembly in Microsomal Preparations from Developing Castor-Bean (*Ricinus Communis*) Endosperm." *The Biochemical Journal* 280 (Pt 2): 507–14.
- Baghel, Sapna, and Yogendra Kumar Bansal. 2015. "In Vitro Regeneration of Oil Yielding Plants-A Review." *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 18 (5): 1022–50. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.971068>.
- Barrangou, Rodolphe, Christophe Fremaux, Hélène Deveau, Melissa Richards, Patrick Boyaval, Sylvain Moineau, Dennis A. Romero, and Philippe Horvath. 2007. "CRISPR Provides Acquired Resistance against Viruses in Prokaryotes." *Science* 315 (5819): 1709–12. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>.
- Berman, Paula, Shahar Nizri, and Zeev Wiesman. 2011a. "Castor Oil Biodiesel and Its Blends as Alternative Fuel." *Biomass and Bioenergy* 35 (7): 2861–66. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.03.024>.
- . 2011b. "Castor Oil Biodiesel and Its Blends as Alternative Fuel." *Biomass and Bioenergy* 35 (7): 2861–66. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.03.024>.
- Bhojwani, S. S. (Sant Saran), and M. K. Razdan. 1996. *Plant Tissue Culture : Theory and Practice*. Elsevier.
- Birch, R G. 1997. "PLANT TRANSFORMATION: Problems and Strategies for Practical Application." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48 (June): 297–326. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.297>.
- Borgato, L., F. Pisani, and A. Furini. 2007. "Plant Regeneration from Leaf Protoplasts of *Solanum Virginianum* L. (Solanaceae)." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88 (3): 247–52. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9196-x>.

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

- Boyes, C.J., F.J. Zapata, and K.C. Sink. 1980. "Isolation, Culture and Regeneration to Plants of Callus Protoplasts of *Salpiglossis Sinuata* L." *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie* 99 (5): 471–74. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(80\)80162-0](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(80)80162-0).
- Broun, P, S Boddupalli, and C Somerville. 1998. "A Bifunctional Oleate 12-Hydroxylase: Desaturase from *Lesquerella Fendleri*." *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 13 (2): 201–10. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00023.x>.
- Brown, Adrian P., Johan T M Kroon, David Swarbreck, Melanie Febrer, Tony R. Larson, Ian A. Graham, Mario Caccamo, and Antoni R. Slabas. 2012. "Tissue-Specific Whole Transcriptome Sequencing in Castor, Directed at Understanding Triacylglycerol Lipid Biosynthetic Pathways." *PLoS ONE* 7 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030100>.
- Caiveau, Olivier, Dominique Fortune, Catherine Cantrel, Alain Zachowski, and François Moreau. 2001. "Consequences of ω -6-Oleate Desaturase Deficiency on Lipid Dynamics and Functional Properties of Mitochondrial Membranes of *Arabidopsis Thaliana*." *Journal of Biological Chemistry* 276 (8): 5788–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006231200>.
- Carte, Jason, Ruiying Wang, Hong Li, Rebecca M. Terns, and Michael P. Terns. 2008. "Cas6 Is an Endoribonuclease That Generates Guide RNAs for Invader Defense in Prokaryotes." *Genes and Development* 22 (24): 3489–96. <https://doi.org/10.1101/gad.1742908>.
- Caspi, Ron, Tomer Altman, Richard Billington, Kate Dreher, Hartmut Foerster, Carol A. Fulcher, Timothy A. Holland, et al. 2014. "The MetaCyc Database of Metabolic Pathways and Enzymes and the BioCyc Collection of Pathway/Genome Databases." *Nucleic Acids Research* 42 (D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1103>.
- Chan, Agnes P., Jonathan Crabtree, Qi Zhao, Hernan Lorenzi, Joshua Orvis, Daniela Puiu, Admasu Melake-Berhan, Kristine M. Jones, Julia Redman, Grace Chen, Edgar B. Cahoon, Melaku Gedil, Mario Stanke, Brian J. Haas, Jennifer R. Wortman, Claire M. Fraser-Liggett, Jacques Ravel, and Pablo D. Rabinowicz. 2010. "Draft Genome Sequence of the Oilseed Species *Ricinus Communis*." *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.1674>.
- Chan, Agnes P, Jonathan Crabtree, Qi Zhao, Hernan Lorenzi, Joshua Orvis, Daniela Puiu, Admasu Melake-Berhan, Kristine M Jones, Julia Redman, Grace Chen, Edgar B Cahoon, Melaku Gedil, Mario Stanke, Brian J Haas, Jennifer R Wortman, Claire M Fraser-Liggett, Jacques Ravel, Pablo D Rabinowicz, et al. 2010. "Draft Genome Sequence of the Ricin-Producing Oilseed Castor Bean." *Nat Biotechnol*. <https://doi.org/10.1038/nbt.1674>.
- Chauhan, Raj Deepika, and Nigel James Taylor. 2018. "Meta-Topolin Stimulates de Novo Shoot Organogenesis and Plant Regeneration in Cassava." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 132 (1): 219–24. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1315-3>.

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

- Chen, Jiang, Qiang Yi, Qiaoheng Song, Yong Gu, Junjie Zhang, Yufeng Hu, Hanmei Liu, Yinghong Liu, Guowu Yu, and Yubi Huang. 2015. “A Highly Efficient Maize Nucellus Protoplast System for Transient Gene Expression and Studying Programmed Cell Death-Related Processes.” *Plant Cell Reports* 34 (7): 1239–51. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1783-z>.
- Citovsky, Vitaly, Guido De Vos, and Patricia Zambryski. 1988. “Single-Stranded DNA Binding Protein Encoded by the VirE Locus of *Agrobacterium Tumefaciens*.” *Science* 240 (4851): 501–4. <https://doi.org/10.1126/science.240.4851.501>.
- Cocking, E. C. 1960. “A Method for the Isolation of Plant Protoplasts and Vacuoles.” *Nature* 187 (4741): 962–63. <https://doi.org/10.1038/187962a0>.
- Conde, Paula, and Conceição Santos. 2006. “An Efficient Protocol for *Ulmus Minor* Mill. Protoplast Isolation and Culture in Agarose Droplets.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86 (3): 359–66. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9122-2>.
- Corbett Research. n.d. “High Resolution Melt Assay Design and Analysis, Rotor-Gene 6000,” 1–24.
- Cui, Jin, Kathryn Kuligowska Mackenzie, Tom Eeckhaut, Renate Müller, and Henrik Lütken. 2019. “Protoplast Isolation and Culture from *Kalanchoë* Species: Optimization of Plant Growth Regulator Concentration for Efficient Callus Production.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 138 (2): 287–97. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01624-4>.
- Davey, Michael R., Paul Anthony, J. Brian Power, and Kenneth C. Lowe. 2005. “Plant Protoplasts: Status and Biotechnological Perspectives.” *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.09.008>.
- deFramond, Annick J., Kenneth A. Barton, and Mary Dell Chilton. 1983. “Mini-Ti: A New Vector Strategy for Plant Genetic Engineering.” *Bio/Technology* 1 (3): 262–69. <https://doi.org/10.1038/nbt0583-262>.
- Deore, Ajay C., and T. Sudhakar Johnson. 2008. “High-Frequency Plant Regeneration from Leaf-Disc Cultures of *Jatropha Curcas* L.: An Important Biodiesel Plant.” *Plant Biotechnology Reports* 2 (1): 7–11. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0042-y>.
- Deveau, Hélène, Josiane E. Garneau, and Sylvain Moineau. 2010. “CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions.” *Annual Review of Microbiology* 64 (1): 475–93. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134123>.
- Díez-Villaseñor, C., C. Almendros, J. García-Martínez, and F. J.M. Mojica. 2010. “Diversity of CRISPR Loci in *Escherichia Coli*.” *Microbiology* 156 (5): 1351–61.

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

<https://doi.org/10.1099/mic.0.036046-0>.

- Doty, Sharon Lafferty, M. Christina Yu, J. Ingrid Lundin, Joe Don Heath, and Eugene W. Nester. 1996. “Mutational Analysis of the Input Domain of the VirA Protein of *Agrobacterium Tumefaciens*.” *Journal of Bacteriology* 178 (4): 961–70. <https://doi.org/10.1128/jb.178.4.961-970.1996>.
- Durrenberger, F., A. Cramer, B. Hohn, and Z. Koukolikova-Nicola. 1989. “Covalently Bound VirD2 Protein of *Agrobacterium Tumefaciens* Protects the T-DNA from Exonucleolytic Degradation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (23): 9154–58. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9154>.
- Er, Tze Kiong, and Jan Gowth Chang. 2012. “High-Resolution Melting: Applications in Genetic Disorders.” *Clinica Chimica Acta*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.09.012>.
- Erp, Harrie van, Philip D. Bates, Julie Burgal, Jay Shockey, and John Browse. 2011. “Castor Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferase Facilitates Efficient Metabolism of Hydroxy Fatty Acids in Transgenic Arabidopsis.” *Plant Physiology* 155 (2): 683–93. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167239>.
- Escobar, Matthew A., and Abhaya M. Dandekar. 2003. “*Agrobacterium Tumefaciens* as an Agent of Disease.” *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00162-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00162-6).
- Fehér, Attila. 2019. “Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology?” *Frontiers in Plant Science* 10 (April): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>.
- Ganesh Kumari, K., M. Ganesan, and N. Jayabalan. 2008. “Somatic Organogenesis and Plant Regeneration in *Ricinus Communis*.” *Biologia Plantarum* 52 (1): 17–25. <https://doi.org/10.1007/s10535-008-0003-x>.
- Gelvin, S. B. 2003. “*Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: The Biology behind the ‘Gene-Jockeying’ Tool.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (1): 16–37. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.1.16-37.2003>.
- Ghedira, Rim, Sylvie De Buck, Jonah Nolf, and Ann Depicker. 2013. “The Efficiency of Arabidopsis Thaliana Floral Dip Transformation Is Determined Not Only by the *Agrobacterium* Strain Used but Also by the Physiology and the Ecotype of the Dipped Plant.” *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26 (7): 823–32. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-12-0267-R>.
- Gil-Correal, Alejandro, Catalina Restrepo-Osorio, Javier Correa Álvarez, and Diego Fernando

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

- Villanueva-Mejía. 2019. “Direct in Vitro Regeneration of Castor Bean Plants (*Ricinus Communis*) Using Epicotyls.” *Bioscience Journal* 35 (2): 347–55.
<https://doi.org/10.14393/BJ-v35n2a2019-41475>.
- Gohlke, Jochen, and Rosalia Deeken. 2014. “Plant Responses to *Agrobacterium Tumefaciens* and Crown Gall Development.” *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Research Foundation.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00155>.
- “Guidance on the Agronomic and Phenotypic Characterisation of Genetically Modified Plants.” 2016. *EFSA Journal* 13 (6). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4128>.
- Guohua, Ma. 1998. “Effects of Cytokinins and Auxins on Cassava Shoot Organogenesis and Somatic Embryogenesis from Somatic Embryo Explants.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1023/A:1006065120629>.
- Hale, Caryn R., Peng Zhao, Sara Olson, Michael O. Duff, Brenton R. Graveley, Lance Wells, Rebecca M. Terns, and Michael P. Terns. 2009. “RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex.” *Cell* 139 (5): 945–56.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.040>.
- Hanahan, Douglas. 1983. “Studies on Transformation of *Escherichia Coli* with Plasmids.” *Journal of Molecular Biology* 166 (4): 557–80. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8).
- Haque, Effi, Hiroaki Taniguchi, Md Mahmudul Hassan, Pankaj Bhowmik, M. Rezaul Karim, Magdalena Śmiech, Kaijun Zhao, Mahfuzur Rahman, and Tofazzal Islam. 2018. “Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technology for the Improvement of Crops Cultivated in Tropical Climates: Recent Progress, Prospects, and Challenges.” *Frontiers in Plant Science* 9 (May): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00617>.
- Harwood, John L. 1996. “Recent Advances in the Biosynthesis of Plant Fatty Acids.” *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*. Elsevier B.V.
[https://doi.org/10.1016/0005-2760\(95\)00242-1](https://doi.org/10.1016/0005-2760(95)00242-1).
- Heigwer, Florian, Grainne Kerr, and Michael Boutros. 2014. “E-CRISP: Fast CRISPR Target Site Identification.” *Nature Methods* 11 (2): 122–23. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2812>.
- Heppard, Elmer P., Anthony J. Kinney, Kevin L. Stecca, and Guo Hua Miao. 1996. “Developmental and Growth Temperature Regulation of Two Different Microsomal ω -6 Desaturase Genes in Soybeans.” *Plant Physiology* 110 (1): 311–19.
<https://doi.org/10.1104/pp.110.1.311>.
- Herrera-Estrella, A., M. Van Montagu, and K. Wang. 1990. “A Bacterial Peptide Acting as a

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

Plant Nuclear Targeting Signal: The Amino-Terminal Portion of Agrobacterium VirD2 Protein Directs a β -Galactosidase Fusion Protein into Tobacco Nuclei.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (24): 9534–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.24.9534>.

Hoekema, A., P. R. Hirsch, P. J.J. Hooykaas, and R. A. Schilperoort. 1983. “A Binary Plant Vector Strategy Based on Separation of Vir- and T-Region of the Agrobacterium Tumefaciens Ti-Plasmid.” *Nature* 303 (5913): 179–80. <https://doi.org/10.1038/303179a0>.

Horgan, R., E. W. Hewett, J. M. Horgan, J. Purse, and P. F. Wareing. 1975. “A New Cytokinin from Populus x Robusta.” *Phytochemistry* 14 (4): 1005–8. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85176-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85176-4).

Horsch, Robert B., Robert T. Fraley, Stephen G. Rogers, Patricia R. Sanders, Alan Lloyd, and Nancy Hoffmann. 1984. “Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants.” *Science* 223 (4635): 496–98. <https://doi.org/10.1126/science.223.4635.496>.

Horvath, Philippe, Dennis A. Romero, Anne Claire Coûté-Monvoisin, Melissa Richards, Hélène Deveau, Sylvain Moineau, Patrick Boyaval, Christophe Fremaux, and Rodolphe Barrangou. 2008. “Diversity, Activity, and Evolution of CRISPR Loci in Streptococcus Thermophilus.” *Journal of Bacteriology* 190 (4): 1401–12. <https://doi.org/10.1128/JB.01415-07>.

Hsu, Patrick D., David A. Scott, Joshua A. Weinstein, F. Ann Ran, Silvana Konermann, Vineeta Agarwala, Yinqing Li, et al. 2013. “DNA Targeting Specificity of RNA-Guided Cas9 Nucleases.” *Nature Biotechnology* 31 (9): 827–32. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>.

Hu, Qiong, Sven B. Andersen, and Lise N. Hansen. 1999. “Plant Regeneration Capacity of Mesophyll Protoplasts from Brassica Napus and Related Species.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59 (3): 189–96. <https://doi.org/10.1023/A:1006417530587>.

Hu, Xiaozhen, Jinlei Zhao, William F. DeGrado, and Andrew N. Binns. 2013. “Agrobacterium Tumefaciens Recognizes Its Host Environment Using ChvE to Bind Diverse Plant Sugars as Virulence Signals.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (2): 678–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215033110>.

Hurtado M., Daniel V., and María Eugenia. Merino M. 1987. *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Editorial Trillas.

HWANG, HAU-HSUAN, MING-HSUAN WANG, YING-LING LEE, YUN-LONG TSAI, YI-HO LI, FONG-JHIH YANG, YU-CHEN LIAO, SHAO-KAI LIN, and ERH-MIN LAI. 2010. “Agrobacterium-Produced and Exogenous Cytokinin-Modulated Agrobacterium-Mediated Plant Transformation.” *Molecular Plant Pathology*, June, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00637.x>.

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

- Hwang, Hau-Hsuan, Manda Yu, and Erh-Min Lai. 2017. “Agrobacterium -Mediated Plant Transformation: Biology and Applications.” *The Arabidopsis Book* 15: e0186. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>.
- Hwang, Woong Y., Yanfang Fu, Deepak Reyon, Morgan L. Maeder, Shengdar Q. Tsai, Jeffry D. Sander, Randall T. Peterson, J. R. Joanna Yeh, and J. Keith Joung. 2013. “Efficient Genome Editing in Zebrafish Using a CRISPR-Cas System.” *Nature Biotechnology* 31 (3): 227–29. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>.
- Ikeuchi, Momoko, Keiko Sugimoto, and Akira Iwase. 2013. “Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression.” *Plant Cell*. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>.
- Jeong, Gwi Taek, and Don Hee Park. 2009. “Optimization of Biodiesel Production from Castor Oil Using Response Surface Methodology.” In *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 156:1–11. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8468-9>.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. “A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.” *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096): 816–21. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
- Jinek, Martin, Alexandra East, Aaron Cheng, Steven Lin, Enbo Ma, and Jennifer Doudna. 2013. “RNA-Programmed Genome Editing in Human Cells.” *ELife* 2 (January): e00471. <https://doi.org/10.7554/eLife.00471>.
- Kanemoto, R. H., A. T. Powell, D. E. Akiyoshi, D. A. Regier, R. A. Kerstetter, E. W. Nester, M. C. Hawes, and M. P. Gordon. 1989. “Nucleotide Sequence and Analysis of the Plant-Inducible Locus PinF from *Agrobacterium Tumefaciens*.” *Journal of Bacteriology* 171 (5): 2506–12. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2506-2512.1989>.
- Keane, P. J., A. Kerr, and P. B. New. 1970. “Crown Gall of Stone Fruit Ii. Identification and Nomenclature of *Agrobacterium* Isolates.” *Australian Journal of Biological Sciences* 23 (3): 585–96. <https://doi.org/10.1071/BI9700585>.
- Kearns, Ellen V., Suzanne Hugly, and Chris R. Somerville. 1991. “The Role of Cytochrome B5 in $\Delta 12$ Desaturation of Oleic Acid by Microsomes of Safflower (*Carthamus Tinctorius* L.)” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 284 (2): 431–36. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90319-E](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90319-E).
- Komari, Toshihiko, Yuji Ishida, and Yukoh Hiei. 2004. “Plant Transformation Technology: *Agrobacterium* -Mediated Transformation.” In *Handbook of Plant Biotechnology*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470869143.kc014>.

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

- Kregten, Maartje Van, Beatrice I. Lindhout, Paul J.J. Hooykaas, and Bert J. Van Der Zaal. 2009. “Agrobacterium-Mediated T-DNA Transfer and Integration by Minimal VirD2 Consisting of the Relaxase Domain and a Type IV Secretion System Translocation Signal.” *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22 (11): 1356–65. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-11-1356>.
- Kreněk, Pavel, Olga Samajová, Ivan Luptovciak, Anna Daskocilová, George Komis, and Jozef Samaj. 2015. “Transient Plant Transformation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, Methods and Applications.” *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.012>.
- Kuluev, B. R., G. R. Gumerova, E. V. Mikhaylova, G. A. Gerashchenkov, N. A. Rozhnova, Z. R. Vershinina, A. V. Khyazev, et al. 2019. “Delivery of CRISPR/Cas Components into Higher Plant Cells for Genome Editing.” *Russian Journal of Plant Physiology* 66 (5): 694–706. <https://doi.org/10.1134/S102144371905011X>.
- Kumlehn, Jochen, Janine Pietralla, Goetz Hensel, Michael Pacher, and Holger Puchta. 2018. “The CRISPR/Cas Revolution Continues: From Efficient Gene Editing for Crop Breeding to Plant Synthetic Biology.” *Journal of Integrative Plant Biology*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jipb.12734>.
- Lacroix, Benoît, and Vitaly Citovsky. 2018. “Beyond *Agrobacterium*-Mediated Transformation: Horizontal Gene Transfer from Bacteria to Eukaryotes.” In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 418:443–62. Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/82_2018_82.
- Lacroix, Benoît, Tzvi Tzfira, Alexander Vainstein, and Vitaly Citovsky. n.d. “A Case of Promiscuity: *Agrobacterium*’s Endless Hunt for New Partners.” Accessed January 30, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.10.004>.
- Larebeke, N. Van, G. Engler, M. Holsters, S. Van Den Elsacker, I. Zaenen, R. A. Schilperoort, and J. Schell. 1974. “Large Plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* Essential for Crown Gall-Inducing Ability.” *Nature* 252 (5479): 169–70. <https://doi.org/10.1038/252169a0>.
- Lee, Chil Woo, Marina Efetova, Julia C. Engelmann, Robert Kramell, Claus Wasternack, Jutta Ludwig-Müller, Rainer Hedrich, and Rosalia Deeken. 2009. “*Agrobacterium tumefaciens* Promotes Tumor Induction by Modulating Pathogen Defense in *Arabidopsis thaliana*.” *Plant Cell* 21 (9): 2948–62. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064576>.
- Lee, Haeng S., Suk W. Kim, Kwang W. Lee, Tage Eriksson, and Jang R. Liu. 1995. “*Agrobacterium*-Mediated Transformation of Ginseng (*Panax ginseng*) and Mitotic Stability of the Inserted β -Glucuronidase Gene in Regenerants from Isolated Protoplasts.” *Plant Cell Reports* 14 (9): 545–49. <https://doi.org/10.1007/BF00231935>.
- Lee, Yong Woog, Shouguang Jin, Woong Seop Sim, and Eugene W. Nester. 1996. “The Sensing

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

of Plant Signal Molecules by Agrobacterium: Genetic Evidence for Direct Recognition of Phenolic Inducers by the VirA Protein.” *Gene* 179 (1): 83–88.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00328-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00328-9).

Lemmon, Zachary H., Nathan T. Reem, Justin Dalrymple, Sebastian Soyk, Kerry E. Swartwood, Daniel Rodriguez-Leal, Joyce Van Eck, and Zachary B. Lippman. 2018. “Rapid Improvement of Domestication Traits in an Orphan Crop by Genome Editing.” *Nature Plants* 4 (10): 766–70. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0259-x>.

Lessl, M, and E Lanka. 1994. “Common Mechanisms in Bacterial Conjugation and Ti-Mediated T-DNA Transfer to Plant Cells.” *Cell* 77 (3): 321–24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90146-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90146-5).

Li, Shan, Songmei Liu, Yanhua Liu, Haiping Lu, Yuanyuan Tan, Jianzhong Huang, Pengcheng Wei, and Qing Yao Shu. 2018. “HRM-Facilitated Rapid Identification and Genotyping of Mutations Induced by CRISPR/ Cas9 Mutagenesis in Rice.” *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 18 (2): 184–91. <https://doi.org/10.1590/1984-70332018v18n2a26>.

Lian, Yu Ji, Xiao Mei Zhao, Guang Zhe Lin, and Hak tae Lim. 2012. “Protoplast Isolation and Culture for Somatic Hybridisation of Rapid Cycling Brassica Rapa with ‘Anand’ CMS and Brassica Juncea.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109 (3): 565–72.
<https://doi.org/10.1007/s11240-012-0114-0>.

Lin, Choun Sea, Chen Tran Hsu, Ling Hung Yang, Lan Ying Lee, Jin Yuan Fu, Qiao Wei Cheng, Fu Hui Wu, et al. 2018. “Application of Protoplast Technology to CRISPR/Cas9 Mutagenesis: From Single-Cell Mutation Detection to Mutant Plant Regeneration.” *Plant Biotechnology Journal*, 2018. <https://doi.org/10.1111/pbi.12870>.

Lin, Jiann-Tsyh, and Arthur Arcinas. 2007. “Regiospecific Analysis of Diricinoleoylacylglycerols in Castor (*Ricinus Communis* L.) Oil by Electrospray Ionization–Mass Spectrometry.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (6): 2209–16. <https://doi.org/10.1021/jf063105f>.

Liu, Pu, and Eugene W. Nester. 2006. “Indoleacetic Acid, a Product of Transferred DNA, Inhibits Vir Gene Expression and Growth of Agrobacterium Tumefaciens C58.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (12): 4658–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600366103>.

Liu, Ying, Yingbin Xue, Jianian Tang, Jianping Chen, and Miao Chen. 2019. “Ef Fi Cient Mesophyll Protoplast Isolation and Development of a Transient Expression System for Castor-Oil Plant (*Ricinus Communis* L .).” <https://doi.org/10.1556/019.70.2019.02>.

Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. 2001. “Analysis of Relative Gene Expression

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method.” *Methods* 25 (4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

Lloyd, Gregory, and Brent McCown. 1980. “Commercially-Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia Latifolia*, by Use of Shoot Tip Culture.” *International Plant Propagators’ Society Proceedings* 30.

Lochlainn, Seosamh T., Stephen Amoah, Neil S. Graham, Khalid Alamer, Juan J. Rios, Smita Kurup, Andrew Stoute, et al. 2011. “High Resolution Melt (HRM) Analysis Is an Efficient Tool to Genotype EMS Mutants in Complex Crop Genomes.” *Plant Methods* 7 (1): 43. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-43>.

Loo, F. J. van de, P. Broun, S. Turner, and C. Somerville. 1995. “An Oleate 12-Hydroxylase from *Ricinus Communis* L. Is a Fatty Acyl Desaturase Homolog.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (15): 6743–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.6743>.

Loo, Frank J. Van De, Pierre Broun, Simon Turner, and Chris Somerville. 1995. “An Oleate 12-Hydroxylase from *Ricinus Communis* L. Is a Fatty Acyl Desaturase Homolog.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (15): 6743–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.6743>.

Lu, Chaofu, James G. Wallis, and John Browse. 2007. “An Analysis of Expressed Sequence Tags of Developing Castor Endosperm Using a Full-Length CDNA Library.” *BMC Plant Biology* 7: 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-42>.

Mahmoud, Sameer N, and Nabeel K Al-Ani. 2016. “Effect of Different Sterilization Methods on Contamination and Viability of Nodal Segments of *Cestrum Nocturnum* L.” *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)* 4 (1): 4–9. <https://doi.org/10.20431/2349-0365.0401002>.

Makarova, Kira S., Daniel H. Haft, Rodolphe Barrangou, Stan J.J. Brouns, Emmanuelle Charpentier, Philippe Horvath, Sylvain Moineau, et al. 2011. “Evolution and Classification of the CRISPR-Cas Systems.” *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>.

Mali, Prashant, Luhan Yang, Kevin M Esvelt, John Aach, Marc Guell, James E DiCarlo, Julie E Norville, and George M Church. 2013. “RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9.” *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121): 823–26. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>.

Marraffini, Luciano A., and Erik J. Sontheimer. 2008. “CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in *Staphylococci* by Targeting DNA.” *Science* 322 (5909): 1843–45. <https://doi.org/10.1126/science.1165771>.

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

- Martineau, B., T. A. Voelker, and R. A. Sanders. 1994. "On Defining T-DNA." *The Plant Cell*, August, 1032–33. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.8.1032>.
- McKeon, T A, G Q Chen, and J T Lin. 2000. "Biochemical Aspects of Castor Oil Biosynthesis." *Biochemical Society Transactions* 28 (6): 972–74.
- Mederos Molina, Sebastiana, and Christian Schobert. 1995. "Micropropagation of *Ricinus Communis*." *Journal of Plant Physiology* 147 (2): 270–72. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81517-8](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81517-8).
- Metje-Sprink, Janina, Thorben Sprink, and Frank Hartung. 2020. "Genome-Edited Plants in the Field." *Current Opinion in Biotechnology* 61: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.08.007>.
- Miquel, M., and J. Browse. 1992. "Arabidopsis Mutants Deficient in Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis: Biochemical and Genetic Characterization of a Plant Oleoyl-Phosphatidylcholine Desaturase." *Journal of Biological Chemistry* 267 (3): 1502–9.
- Miquel, Martine, and J Browse. 1992. "Arabidopsis Mutants Deficient in Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis. Biochemical and Genetic Characterization of a Plant Oleoyl-Phosphatidylcholine Desaturase." *Journal of Biological Chemistry* 267 (3): 1502–9. <http://www.jbc.org/content/267/3/1502.abstract>.
- Modrzejewski, Dominik, Frank Hartung, Thorben Sprink, Dörthe Krause, Christian Kohl, and Ralf Wilhelm. 2019. "What Is the Available Evidence for the Range of Applications of Genome-Editing as a New Tool for Plant Trait Modification and the Potential Occurrence of Associated off-Target Effects: A Systematic Map." *Environmental Evidence* 8 (1). <https://doi.org/10.1186/s13750-019-0171-5>.
- Moreau, Robert A., and Paul K. Stumpf. 1981. "Recent Studies of the Enzymic Synthesis of Ricinoleic Acid by Developing Castor Beans." *Plant Physiology* 67 (4): 672–76. <https://doi.org/10.1104/pp.67.4.672>.
- Mroginski, LA, and William M. Roca. 1991. "Establecimiento de Cultivos de Tejidos Vegetales in Vitro."
- Naito, Yuki, Kimihiro Hino, Hidemasa Bono, and Kumiko Ui-Tei. 2015a. "CRISPRdirect: Software for Designing CRISPR/Cas Guide RNA with Reduced off-Target Sites." *Bioinformatics* 31 (7): 1120–23. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu743>.
- . 2015b. "CRISPRdirect: Software for Designing CRISPR/Cas Guide RNA with Reduced off-Target Sites." *Bioinformatics* 31 (7): 1120–23. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu743>.

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

- Nakamura, Manabu T., and Takayuki Y. Nara. 2004. "STRUCTURE, FUNCTION, AND DIETARY REGULATION OF $\Delta 6$, $\Delta 5$, AND $\Delta 9$ DESATURASES." *Annual Review of Nutrition* 24 (1): 345–76. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.121803.063211>.
- Nanjareddy, Kalpana, Lourdes Blanco, Manoj Kumar Arthikala, Xóchitl Alvarado-Affantranger, Carmen Quinto, Federico Sánchez, and Miguel Lara. 2016. "A Legume TOR Protein Kinase Regulates Rhizobium Symbiosis and Is Essential for Infection and Nodule Development." *Plant Physiology* 172 (3): 2002–20. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00844>.
- Narasimhulu, S B, X B Deng, R Sarria, and S B Gelvin. 1996. "Early Transcription of Agrobacterium T-DNA Genes in Tobacco and Maize." *The Plant Cell* 8 (5): 873–86. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.5.873>.
- Nishimura, Mikio, and Harry Beevers. n.d. "Isolation of Intact Plastids from Protoplasts from Castor Bean Endosperm." *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists (ASPB). Accessed January 30, 2020. <https://doi.org/10.2307/4265367>.
- . 1978. "Hydrolases in Vacuoles from Castor Bean Endosperm." *Plant Physiology* 62 (1): 44–48. <https://doi.org/10.1104/pp.62.1.44>.
- Nonaka, Satoko, Ken-Ichi Yuhashi, Keita Takada, Masayuki Sugaware, Kiwamu Minamisawa, and Hiroshi Ezura. 2008. "Ethylene Production in Plants during Transformation Suppresses Vir Gene Expression in *Agrobacterium Tumefaciens*." *New Phytologist* 178 (3): 647–56. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02400.x>.
- Ogunniyi, D. S. 2006. "Castor Oil: A Vital Industrial Raw Material." *Bioresource Technology* 97 (9): 1086–91. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.028>.
- Pellegrino, Elisa, Stefano Bedini, Marco Nuti, and Laura Ercoli. 2018. "Impact of Genetically Engineered Maize on Agronomic, Environmental and Toxicological Traits: A Meta-Analysis of 21 Years of Field Data." *Scientific Reports* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21284-2>.
- Perez Ponce, J.N, Y Alvarado, J Pérez, P Orellana, J.N. Pérez-Asensio, DE LA SERNA J PEREZ, D. Agramonte, et al. 1998. "Propagación y Mejora Genética de Plantas Por Biotecnología."
- Perry, Bruce A. 1943. "CHROMOSOME NUMBER AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS IN THE EUPHORBACEAE." *American Journal of Botany* 30 (7): 527–43. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1943.tb14796.x>.
- Pfaffl, Michael W, Ales Tichopad, Christian Prgomet, and Tanja P Neuvians. 2004. "Determination of Stable Housekeeping Genes, Differentially Regulated Target Genes and

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

Sample Integrity: BestKeeper-Excel-Based Tool Using Pair-Wise Correlations.” *Biotechnology Letters*. Vol. 26. <http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/bestkeeper.html>.

- Pierik, R.L.M. 1990. “Cultivo in Vitro de Las Plantas Superiores.” *Ediciones Mundi Prensa, Madrid, Spain*.
- Pitzschke, Andrea, and Helene Persak. 2012. “Poinsettia Protoplasts - a Simple, Robust and Efficient System for Transient Gene Expression Studies.” *Plant Methods* 8 (1). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-14>.
- Rampadarath, Sillma, and Daneshwar Puchooa. 2016. “In Vitro Antimicrobial and Larvicidal Properties of Wild *Ricinus Communis* L. in Mauritius.” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6 (2): 100–107.
- Rao, K Sankara, and A H Prakash. 1995. “A Simple Method for the Isolation of Plant Protoplasts.” *J. Biosci.* Vol. 20.
- Reed, Gudrun H., Jana O. Kent, and Carl T. Wittwer. 2007. “High-Resolution DNA Melting Analysis for Simple and Efficient Molecular Diagnostics.” *Pharmacogenomics* 8 (6): 597–608. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.6.597>.
- Richards, Donald Earl, Rebecca D. Taylor, and Denis J. Murphy. 1993. “Localization and Possible Substrate Requirement of the Oleate 12-Hydroxylase of Developing *Ricinus Communis* Seeds.”
- Ricroch, Agnès, Pauline Clairand, and Wendy Harwood. 2017. “Use of CRISPR Systems in Plant Genome Editing: Toward New Opportunities in Agriculture.” *Emerging Topics in Life Sciences* 1 (2): 169–82. <https://doi.org/10.1042/etls20170085>.
- Roberts, L M, F I Lamb, D J Pappin, and J M Lord. 1985. “The Primary Sequence of *Ricinus Communis* Agglutinin. Comparison with Ricin.” *The Journal of Biological Chemistry* 260 (29): 15682–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999130>.
- Roth, D. B., and J. H. Wilson. 1985. “Relative Rates of Homologous and Nonhomologous Recombination in Transfected DNA.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (10): 3355–59. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.10.3355>.
- Schindele, Angelina, Annika Dorn, and Holger Puchta. 2020. “CRISPR/Cas Brings Plant Biology and Breeding into the Fast Lane.” *Current Opinion in Biotechnology* 61: 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.08.006>.
- Schmidt, Hermann, Thomas Dresselhaus, Friedrich Buck, and Ernst Heinz. 1994. “Purification and PCR-Based cDNA Cloning of a Plastidial n-6 Desaturase.” *Plant Molecular Biology*

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

26 (2): 631–42. <https://doi.org/10.1007/BF00013749>.

- Schrammeijer, B, E Risseeuw, W Pansegrau, T J Regensburg-Tuïnk, W L Crosby, and P J Hooykaas. 2001. “Interaction of the Virulence Protein VirF of *Agrobacterium Tumefaciens* with Plant Homologs of the Yeast Skp1 Protein.” *Current Biology : CB* 11 (4): 258–62. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00069-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00069-0).
- Shan, Qiwei, Yanpeng Wang, Jun Li, Yi Zhang, Kunling Chen, Zhen Liang, Kang Zhang, et al. 2013. “Targeted Genome Modification of Crop Plants Using a CRISPR-Cas System.” *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nbt.2650>.
- Shimoda, N, A Toyoda-Yamamoto, S Aoki, and Y Machida. 1993. “Genetic Evidence for an Interaction between the VirA Sensor Protein and the ChvE Sugar-Binding Protein of *Agrobacterium*.” *The Journal of Biological Chemistry* 268 (35): 26552–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8253785>.
- Shmakov, Sergey, Omar O. Abudayyeh, Kira S. Makarova, Yuri I. Wolf, Jonathan S. Gootenberg, Ekaterina Semenova, Leonid Minakhin, et al. 2015. “Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems.” *Molecular Cell* 60 (3): 385–97. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.008>.
- Simko, Ivan. 2016. “High-Resolution DNA Melting Analysis in Plant Research.” *Trends in Plant Science* 21 (6): 528–37. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.004>.
- Singer, Kamy Kalman. 2013. “T-DNA Integration during *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Plants.”
- Slabas, Antoni R., and Tony Fawcett. 1992. “The Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipid Biosynthesis.” *Plant Molecular Biology* 19 (1): 169–91. <https://doi.org/10.1007/BF00015613>.
- Smith, Erwin F., and C. O. Townsend. 1907. “A Plant-Tumor of Bacterial Origin.” *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.25.643.671>.
- Smith, J. 2001. “The Influence of DNA Double-Strand Break Structure on End-Joining in Human Cells.” *Nucleic Acids Research* 29 (23): 4783–92. <https://doi.org/10.1093/nar/29.23.4783>.
- Smith, M. A., L. Jonsson, S. Stymne, and K. Stobart. 1992. “Evidence for Cytochrome B5 as an Electron Donor in Ricinoleic Acid Biosynthesis in Microsomal Preparations from Developing Castor Bean (*Ricinus Communis* L.).” *Biochemical Journal* 287 (1): 141–44. <https://doi.org/10.1042/bj2870141>.
- Smith, Mark A., Hangsik Moon, Gangamma Chowrira, and Ljerka Kunst. 2003. “Heterologous

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

Expression of a Fatty Acid Hydroxylase Gene in Developing Seeds of Arabidopsis Thaliana.” *Planta* 217 (3): 507–16. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1015-6>.

Soares, Douglas Moraes Mendel, Mariana Cansian Sattler, Marcia Flores da Silva Ferreira, and Milene Miranda Praça-Fontes. 2016. “Assessment of Genetic Stability in Three Generations of In Vitro Propagated Jatropha Curcas L. Plantlets Using ISSR Markers.” *Tropical Plant Biology* 9 (4): 229–38. <https://doi.org/10.1007/s12042-016-9171-6>.

Solórzano-Cascante, Paúl, Neiva Sánchez-Chiang, and Víctor M. Jiménez. 2018. “Explant Type, Culture System, 6-Benzyladenine, Meta-Topolin and Encapsulation Affect Indirect Somatic Embryogenesis and Regeneration in Carica Papaya L.” *Frontiers in Plant Science* 871 (December): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01769>.

Sparkes, Imogen A., John Runions, Anne Kearns, and Chris Hawes. 2006. “Rapid, Transient Expression of Fluorescent Fusion Proteins in Tobacco Plants and Generation of Stably Transformed Plants.” *Nature Protocols* 1 (4): 2019–25. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.286>.

Stachel, Scott E., Eric Messens, Marc Van Montagu, and Patricia Zambryski. 1985. “Identification of the Signal Molecules Produced by Wounded Plant Cells That Activate T-DNA Transfer in Agrobacterium Tumefaciens.” *Nature* 318 (6047): 624–29. <https://doi.org/10.1038/318624a0>.

Stoutjesdijk, Peter A., Surinder P. Singh, Qing Liu, Clive J. Hurlstone, Peter A. Waterhouse, and Allan G. Green. 2002. “HpRNA-Mediated Targeting of the Arabidopsis FAD2 Gene Gives Highly Efficient and Stable Silencing.” *Plant Physiology* 129 (4): 1723–31. <https://doi.org/10.1104/pp.006353>.

Strauss, Steven H, and Joanna K Sax. 2016. “Ending Event-Based Regulation of GMO Crops.” *Nature Biotechnology* 34 (5): 474–77. <https://doi.org/10.1038/nbt.3541>.

Subramoni, Sujatha, Naeem Nathoo, Eugene Klimov, and Ze Chun Yuan. 2014. “Agrobacterium Tumefaciens Responses to Plant-Derived Signaling Molecules.” *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00322>.

Sujatha, M., T. P. Reddy, and M. J. Mahasi. 2008a. “Role of Biotechnological Interventions in the Improvement of Castor (*Ricinus Communis* L.) and *Jatropha Curcas* L.” *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.004>.

———. 2008b. “Role of Biotechnological Interventions in the Improvement of Castor (*Ricinus Communis* L.) and *Jatropha Curcas* L.” *Biotechnology Advances* 26 (5): 424–35. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.004>.

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

- Sujatha, M, H P S Makkar, and K Becker. 2005. "Shoot Bud Proliferation from Axillary Nodes and Leaf Sections of Non-Toxic *Jatropha Curcas* L." *Plant Growth Regulation* 47 (1): 83–90. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-0859-0>.
- Sujatha, M, and T P Reddy. 1998. "Differential Cytokinin Effects on the Stimulation of in Vitro Shoot Proliferation from Meristematic Explants of Castor (*Ricinus Communis* L.)." *Plant Cell Reports* 17 (6): 561–66. <https://doi.org/10.1007/s002990050442>.
- Taylor, Sean, Rachel Scott, Richard Kurtz, Carl Fisher, and Viresh Patel. 2009. "A Practical Guide to High Resolution Melt Analysis Genotyping." *Bio-Rad Laboratories Technical Note*. <http://www.americanbiotechnologist.com/blog/wp-content/uploads/2010/10/HRM-tech-note.pdf>.
- Terns, Rebecca M., and Michael P. Terns. 2014. "CRISPR-Based Technologies: Prokaryotic Defense Weapons Repurposed." *Trends in Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.01.003>.
- Thomas, Thuruthiyil Dennis, and Rakhi Chaturvedi. 2008. "Endosperm Culture: A Novel Method for Triploid Plant Production." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9336-6>.
- Thurtle-Schmidt, Deborah M., and Te Wen Lo. 2018. "Molecular Biology at the Cutting Edge: A Review on CRISPR/CAS9 Gene Editing for Undergraduates." *Biochemistry and Molecular Biology Education* 46 (2): 195–205. <https://doi.org/10.1002/bmb.21108>.
- Tian, Shouwei, Linjian Jiang, Qiang Gao, Jie Zhang, Mei Zong, Haiying Zhang, Yi Ren, et al. 2017. "Efficient CRISPR/Cas9-Based Gene Knockout in Watermelon." *Plant Cell Reports* 36 (3): 399–406. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2089-5>.
- Tudses, Nootjaree, Siripong Premjet, and Duangporn Premjet. 2014. "Optimal Conditions for High-Yield Protoplast Isolations of *Jatropha Curcas* L . And *Ricinus Communis* L Optimal Conditions for High-Yield Protoplast Isolations Of," no. May. <https://doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2014.14.03.12313>.
- . 2015. "Establishment of Method for Protoplast Fusion with PEG-Mediated between *Jatropha Curcas* L . and *Ricinus Communis* L .," no. January.
- Vanaja, M., M. Jyothi, P. Ratnakumar, P. Vagheera, P. Raghuram Reddy, N. Jyothi Lakshmi, S.K. Yadav, M. Maheshwari, and B. Venkateswarlu. 2018. "Growth and Yield Responses of Castor Bean (*Ricinus Communis* L.) at Two Enhanced CO₂ Levels." *Plant, Soil and Environment* 54 (No. 1): 38–46. <https://doi.org/10.17221/386-pse>.
- Vandesompele, J., Katleen De Preter, Filip Pattyn, Bruce Poppe, Nadine Van Roy, Anne De

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

- Paepe, and Frank Speleman. 2002. “Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes.” *Genome Biology* 3 (7). <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.
- Vergunst, Annette C., Miranda C.M. Van Lier, Amke Den Dulk-Ras, Thomas A. Grosse Stüve, Anette Ouwehand, and Paul J.J. Hooykaas. 2005. “Positive Charge Is an Important Feature of the C-Terminal Transport Signal of the VirB/D4-Translocated Proteins of *Agrobacterium*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (3): 832–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406241102>.
- Vijayakumar, Jeyachandran, Ponnirul Ponmanickam, P. Samuel, D. N. P. Sudarmani, and J. Pandiarajan. 2017. “Influence of Meta-Topolin on Efficient Plant Regeneration via Micropropagation and Organogenesis of Safflower (<I>Carthamus Tinctorius</I> L.) Cv. NARI-H-15.” *American Journal of Plant Sciences* 08 (04): 688–705. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.84048>.
- Villanueva-Mejía, Diego F. 2018. “Modern Biotechnology for Agricultural Development in Colombia.” *Ingeniería y Ciencia* 14 (28): 169–94. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.14.28.7>.
- Virts, E. L., and S. B. Gelvin. 1985. “Analysis of Transfer of Tumor-Inducing Plasmids from *Agrobacterium Tumefaciens* to *Petunia* Protoplasts.” *Journal of Bacteriology* 162 (3): 1030–38.
- Wang, Lijun, Xiaoling Jiang, Lei Wang, Wei Wang, Chunling Fu, Xingchu Yan, and Xinxin Geng. 2019a. “A Survey of Transcriptome Complexity Using PacBio Single-Molecule Real-Time Analysis Combined with Illumina RNA Sequencing for a Better Understanding of Ricinoleic Acid Biosynthesis in *Ricinus Communis*.” *BMC Genomics* 20 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5832-9>.
- . 2019b. “A Survey of Transcriptome Complexity Using PacBio Single-Molecule Real-Time Analysis Combined with Illumina RNA Sequencing for a Better Understanding of Ricinoleic Acid Biosynthesis in *Ricinus Communis*.” *BMC Genomics* 20 (1): 456. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5832-9>.
- Wang, Tim, Jenny J Wei, David M Sabatini, and Eric S Lander. 2014. “Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System.” *Science* 343 (6166): 80 LP – 84. <https://doi.org/10.1126/science.1246981>.
- Weber, Hans. 2002. “Fatty Acid-Derived Signals in Plants.” *Trends in Plant Science* 7 (5): 217–24. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02250-1](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02250-1).
- Wiedenheft, Blake, Esther Van Duijn, Jelle Bultema, Saktham Waghmare, Kaihong Zhou,

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

- Arjan Barendregt, Wiebke Westphal, et al. 2011. “RNA-Guided Complex from a Bacterial Immune System Enhances Target Recognition through Seed Sequence Interactions.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (25): 10092–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102716108>.
- Willig, Christopher J., Kaixuan Duan, and Zhanyuan J. Zhang. 2018. “Transcriptome Profiling of Plant Genes in Response to *Agrobacterium Tumefaciens*-Mediated Transformation.” In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 418:319–48. Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/82_2018_115.
- Wojciechowska-Durczyńska, Katarzyna, Kinga Krawczyk-Rusiecka, Anna Cyniak-Magierska, Arkadiusz Zygmunt, Elżbieta Gałęcka, and Andrzej Lewiński. 2010. “Relative Quantification of PIK3CA Gene Expression Level in Fine-Needle Aspiration Biopsy Thyroid Specimens Collected from Patients with Papillary Thyroid Carcinoma and Non-Toxic Goitre by Real-Time RT-PCR.” *Thyroid Research* 3 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/1756-6614-3-5>.
- Woo, Je Wook, Jungeun Kim, Soon Il Kwon, Claudia Corvalán, Seung Woo Cho, Hyeran Kim, Sang Gyu Kim, Sang Tae Kim, Sunghwa Choe, and Jin Soo Kim. 2015. “DNA-Free Genome Editing in Plants with Preassembled CRISPR-Cas9 Ribonucleoproteins.” *Nature Biotechnology* 33 (11): 1162–64. <https://doi.org/10.1038/nbt.3389>.
- Wu, Jun Zheng, Qin Liu, Xiao Shan Geng, Kai Mian Li, Li Juan Luo, and Jin Ping Liu. 2017. “Highly Efficient Mesophyll Protoplast Isolation and PEG-Mediated Transient Gene Expression for Rapid and Large-Scale Gene Characterization in Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz).” *BMC Biotechnology*. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0349-2>.
- Yao, Liping, Xiong Liao, Zhizhe Gan, Xiang Peng, Peng Wang, Shaojuan Li, and Tianhong Li. 2016. “Protoplast Isolation and Development of a Transient Expression System for Sweet Cherry (*Prunus Avium* L.).” *Scientia Horticulturae* 209 (September): 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.003>.
- Yoo, Sang Dong, Young Hee Cho, and Jen Sheen. 2007. “*Arabidopsis* Mesophyll Protoplasts: A Versatile Cell System for Transient Gene Expression Analysis.” *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199>.
- Young, C., and E. W. Nester. 1988. “Association of the VirD2 Protein with the 5’ End of T Strands in *Agrobacterium Tumefaciens*.” *Journal of Bacteriology* 170 (8): 3367–74. <https://doi.org/10.1128/jb.170.8.3367-3374.1988>.
- Zastrow-Hayes, Gina M., Haining Lin, Amy L. Sigmund, Jenna L. Hoffman, Clara M. Alarcon, Kevin R. Hayes, Todd A. Richmond, Jeffery A. Jeddloh, Gregory D. May, and Mary K.

Hacia el mejoramiento genético de *Ricinus communis*: Entendiendo el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

- Beatty. 2015. “Southern-by-Sequencing: A Robust Screening Approach for Molecular Characterization of Genetically Modified Crops.” *Plant Genome* 8 (1). <https://doi.org/10.3835/plantgenome2014.08.0037>.
- Zetsche, Bernd, Jonathan S. Gootenberg, Omar O. Abudayyeh, Ian M. Slaymaker, Kira S. Makarova, Patrick Essletzbichler, Sara E. Volz, et al. 2015. “Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System.” *Cell* 163 (3): 759–71. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>.
- Zhang, Ji Xing, Xiao Yu Wang, Zi Zhou Feng, Xue Jun Geng, Sha Moli Mu, Hong Yan Huo, Huan Tong, et al. 2016. “In Vitro Establishment of a Highly Effective Method of Castor Bean (*Ricinus Communis* L.) Regeneration Using Shoot Explants.” *Journal of Integrative Agriculture* 15 (6): 1417–22. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61286-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61286-2).
- Zhi, Li, Susan TeRonde, Sandra Meyer, Maren L. Arling, James C. Register, Zuo Yu Zhao, Todd J. Jones, and Ajith Anand. 2015. “Effect of Agrobacterium Strain and Plasmid Copy Number on Transformation Frequency, Event Quality and Usable Event Quality in an Elite Maize Cultivar.” *Plant Cell Reports* 34 (5): 745–54. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1734-0>.

Capítulo III. Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9

3.1.Introducción

Agrobacterium tumefaciens es una proteobacteria alpha de la familia Rhizobiaceae (Keane, Kerr, and New 1970). Es una bacteria del suelo y gramnegativa. Esta bacteria es conocida por tener la habilidad de realizar una transferencia de genes horizontal entre dominios. En 1907 se identificó la bacteria como la generadora de la enfermedad “crown gall” (E. F. Smith and Townsend 1907). La enfermedad se caracteriza por formar conglomerados de células que forma tumores en raíz, tallo o área de la corona, estos tumores de agallas son el resultado de la transferencia del plásmido inductor de tumores (Ti) por parte de *Agrobacterium* a la célula de la planta y consecutivamente una integración estable de este DNA al genoma de la planta (Van Larebeke et al. 1974).

Por su característica particular de transferencia de genes, *Agrobacterium* se ha estudiado ampliamente como vector para ingeniería genética de plantas. Es por esto que esta bacteria fue utilizada como el primer método para la generación de plantas transgénicas (deFramond, Barton, and Chilton 1983). La biotecnología moderna agrícola tiene como núcleo la transformación genética de plantas, en donde se hace posible la inserción de secuencias de DNA foráneo en los genomas de las plantas. Dentro de los métodos para la transformación genética, existen dos principales, el primero es la transformación mediada por *Agrobacterium* en inglés “*Agrobacterium*-mediated transformación” y la segunda es la biobalística es que el bombardeo de partículas de oro o tungsteno recubiertas con ADN foráneo, sin embargo, existe cierta preferencia por el primer método, puesto que la metodología es sencilla, es altamente reproducible, puede transferir fragmentos entre 30 y 150kb (Gelvin 2003; Komari, Ishida, and Hiei 2004). A pesar de la versatilidad del uso de *Agrobacterium* para la transformación genética de plantas existen limitantes como lo es la integración aleatoria de la integración del transgén y variaciones entre los eventos de transformación.

En los últimos años, la tecnología de transformación mediada por *Agrobacterium* se ha visto mejorada o “actualizada” con la adopción de la tecnología CRISPR/Cas9 (Willig, Duan, and Zhang 2018), para la edición de genes (inserción o delección de genes), lo que hace que la combinación de *A. tumefaciens* y el sistema CRISPR/Cas9 una herramienta eficiente, robusto y rápido para la edición de genomas de plantas.

Por otro lado, la edición de genomas de plantas que no conlleva la introducción de DNA foráneo es una alternativa ideal al método mediado por *Agrobacterium* (tradicional) porque evita muchas regulaciones en términos de bioseguridad, en aspectos relacionados con las plantas genéticamente modificadas que terminan siendo transgénicas. Una metodología que está a la vanguardia de la edición usando CRISPR/cas9 es la transfección de complejos pre-ensamblados de la proteína Cas9 y el RNA guía dentro de los protoplastos de las plantas. Esta técnica ha sido exitosa en *Arabidopsis thaliana*, tabaco, lechuga y arroz, y estas plantas editadas contienen pequeñas inserciones o

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9
deleciones que son indistinguibles de alguna variación genética que pueda suceder de manera natural (Woo et al. 2015)

Buscando obtener plantas de *R. communis* editadas genéticamente con alta precisión, y orientadas al incremento en la producción de ácido ricinoleico, en este capítulo de la tesis se buscó usar dos metodologías para la aplicación de la tecnología Crispr/Cas9. En una primera parte se contempló el uso de *Agrobacterium tumefaciens* como mediador para la entrega del vector de expresión de tipo Crispr/Cas9. En la segunda parte se abordó la edición genética haciendo uso de transfección de la Ribonucleoproteína que está compuesta de cada una de las opciones de sgRNA y la enzima Cas9, a los protoplastos de *R. communis* mediada por PEG-4000.

3.2.Objetivos

3.2.1. Objetivo general

Desarrollar líneas *in vitro* de *R. communis* editadas genéticamente, mediante la transfección directa de ribonucleoproteínas vía protoplastos y la transformación de células de epicótilo con *Agrobacterium tumefaciens*, con miras al incremento de la producción de ácido ricinoleico.

3.2.2. Objetivos específicos

- a. Transformar genéticamente plántulas de *R. communis* con el vector de expresión de CRISPR/Cas9 mediante el co-cultivo de epicótilos de la planta con *Agrobacterium tumefaciens*, dirigidas al gen FAD2 para su mutación
- b. Inducir una mutación del gen FAD2 en plántulas de *R. communis*, mediante la transfección de protoplastos con ribonucleoproteínas Crispr/Cas9.
- c. Caracterizar molecularmente las plántulas de *R. communis* regeneradas *in vitro* y procedentes de los eventos de transformación y transfección genética, para la identificación de posibles inserciones y deleciones en el gen de interés.

3.3.Marco teórico

3.3.1. *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens es una proteobacteria alpha de la familia Rhizobiaceae, gramnegativa y presente en el suelo, conocida por tener la habilidad de realizar una transferencia de genes horizontal entre dominios. En 1907 se identificó la bacteria como la generadora de la enfermedad “crown gall” (E. F. Smith and Townsend 1907), enfermedad que se caracteriza por formar

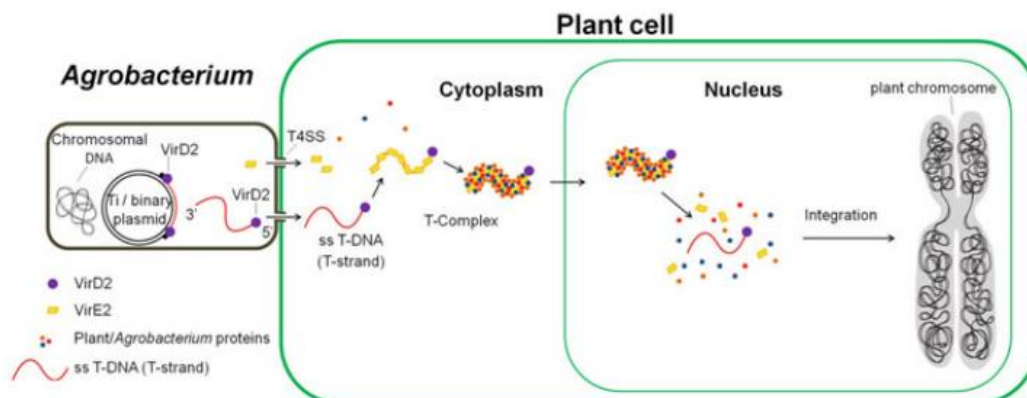
conglomerados de células que forma tumores en raíz, tallo o área de la corona, estos tumores de agallas son el resultado de la transferencia del plásmido inductor de tumores (Ti) por parte de *Agrobacterium* a la célula de la planta y consecutivamente una integración estable de este DNA al genoma de la planta (Van Larebeke et al. 1974). El plásmido Ti transferido contiene genes que causan una división descontrolada de las células de las plantas los cuales alteran el balance hormonal de la planta, mientras otros genes se encargan de codificar proteínas que promueven la producción de opinas, las cuales son utilizadas por las colonias de *Agrobacterium* debido a que son aminoácidos con esqueletos de carbono, que son aprovechados por la bacteria como fuente de carbono y nitrógeno (Escobar and Dandekar 2003).

3.3.1.1. Transferencia del T-DNA

Para la transformación genética mediada por *Agrobacterium*, es necesario que el plásmido Ti tenga dentro de sus componentes el T-DNA, el cual es una región conservada de 25 bp con repeticiones imperfectas en los finales de la secuencia, esto último se denomina secuencias de borde. El segundo componente es la región de virulencia (vir) que codifica proteínas que apoyan la maquinaria que está implicada en la transferencia del T-DNA (H.-H. Hwang, Yu, and Lai 2017). La transferencia del T-DNA desde *Agrobacterium* hasta la célula de la planta comienza dentro de la bacteria cuando el T-DNA es separado del plásmido parental (plásmido Ti en cepas naturales y plásmido binario para cepas de laboratorio) (Lessl and Lanka 1994).

Esta separación del T-DNA comienza cuando el complejo de la helicasa VirD1 y la endonucleasa VirD2, une el extremo izquierdo (LB) y el borde derecho (RB) de la región T-DNA (Durrenberger et al. 1989). Durante el proceso de separación se forma un T-DNA de una sola hebra (T-strand) el cual tiene unido una proteína VirD2 de manera covalente al extremo 5' del T-strand del borde derecho (Young and Nester 1988). La finalidad de la proteína VirD2 anclada es dirigir el T-DNA de una sola hebra hacia el citoplasma de la célula de la planta haciendo uso de la proteína de secreción tipo IV de *Agrobacterium* (T4S) (Vergunst et al. 2005; Van Kregten et al. 2009). Cuando el T-strand se encuentra en el citoplasma, se forma un complejo T (T-complex) el cual consiste en T-DNA de una sola hebra cubierto por varias proteínas VirE2 que son proteínas de unión a cadena sencilla (Citovsky, De Vos, and Zambryski 1988), estas proteínas fueron secretadas por *Agrobacterium* a la planta. La formación de T-complex tiene como finalidad proteger el T-strand de la degradación (Durrenberger et al. 1989) y adicionalmente facilitar su transporte hacia el núcleo gracias al dominio de señal de localización nuclear (NLS) que tiene la proteína VirD2 y VirE2 (Herrera-Estrella, Van Montagu, and Wang 1990).

Figura 32. Ilustración que describe la transferencia de DNA por parte de *Agrobacterium* a la célula de la planta. Tomado de (Singer 2013)



3.3.1.2. Integración del T-DNA

Cuando el complejo T ingresa al núcleo, se desprenden todas las proteínas de dicho complejo para permitir la integración del T-DNA de una sola hebra. Según estudios por Schrammeijer et al. 2001, hipotetizan que el despojo de las proteínas del complejo T se lleva a cabo por la acción de VirF y por la maquinaria de degradación proteasomal de la planta. Durante el proceso de transferencia, a la célula de la planta pueden ingresar varias moléculas de T-DNA de manera simultánea (Virts and Gelvin 1985), sin embargo, se ha mostrado que el porcentaje de moléculas de T-DNA en el núcleo que eventualmente se integran al genoma de la planta, es relativamente bajo (Narasimhulu et al. 1996; Ghedira et al. 2013).

Para la generación de plantas transgénicas, el ADN de interés se clona entre los bordes del T-DNA y posteriormente es la región que se va a integrar al genoma de la planta. Para propósitos biotecnológicos, las cepas de *Agrobacterium* que se emplean son genéticamente modificadas, puesto que se les ha removido los genes que inducen tumor. Vale la pena aclarar que eliminar estos genes, no afecta la capacidad de transferir el T-DNA modificado ya que los bordes derechos e izquierdo no se ven alterados (Hoekema et al. 1983). Al momento de integrarse el T-DNA deseado se pueden lograr dos tipos de transformación; transformación estable y transformación transiente. La transformación estable es utilizada cuando se quieren generar plantas transgénicas. La expresión transiente de genes foráneos se usa cuando se pretende manipular genomas de las plantas, en este caso las moléculas de T-DNA se expresan por unos pocos días antes de que se silencien los genes, se usa comúnmente para investigar la localización celular de proteínas o para producir y aislar proteínas in planta (Sparkes et al. 2006).

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9

La integración del T-DNA se considera como un proceso que no es preciso ni limpio, características atribuidas a que *Agrobacterium* rara vez conserva sus dos bordes después de la integración en la planta y a que las inserciones a menudo incluyen otras secuencias de ADN de *Agrobacterium*, secuencias que usualmente provienen del plásmido Ti o binario (Martineau, Voelker, and Sanders 1994).

3.3.1.3. Genes de virulencia de *A. tumefaciens* en respuesta a señales de la planta

En la naturaleza, cuando las plantas presentan algún tipo de herida se despliega un amplio rango de compuestos químicos que pueden actuar como agentes quimiotácticos y atraer a *Agrobacterium tumefaciens* a los sitios de herida para infectar las plantas (H.-H. Hwang, Yu, and Lai 2017). Las heridas de las plantas secretan savia con un pH acidificado (5.0 a 5.8) y con alto contenido en compuestos fenólicos, en los que se resalta la presencia de precursores de lignina y flavonoides, estos compuestos actúan en primera instancia como barrera microbiana, particularmente estimulan la expresión genética de los genes de virulencia de *A. tumefaciens*. La 3,5-dimethoxy acetophenone (acetosiringona) es uno de aquellos fenoles que ha sido bastante estudiado ya que es uno de los compuestos más efectivos para inducir los genes *vir* (Stachel et al. 1985).

Para iniciar la ruta de señalización, los compuestos fenólicos de la planta interactúan de manera directa o indirecta con el sensor transmembranal VirA. Mediante evidencia genética se ha podido demostrar que VirA censa directamente los compuestos fenólicos que son requeridos para la activación de los genes *vir* (H. S. Lee et al. 1995; Y. W. Lee et al. 1996). Una proteína que une glucosa/galactosa (ChvE) interactúa con VirA y potencia la activación de genes *vir* por medio de la unión de azúcares (Shimoda et al. 1993; Doty et al. 1996). Adicionalmente, la afinidad de la proteína ChevE por los azúcares aumenta en condiciones de bajo pH, lo que sugiere una relación entre los azúcares y la respuesta a la acidez en *A. tumefaciens* (X. Hu et al. 2013).

Puesto que las moléculas fenólicas son bacteriostáticas a altas concentraciones, *A. tumefaciens* también alberga enzimas como la VirH2 para la detoxificación de compuestos fenólicos dañinos secretados por las heridas de las plantas (Kanemoto et al. 1989).

Varios estudios han demostrado que las auxinas y citoquininas no contribuyen únicamente a la formación de tumores; también afecta la fisiología y expresión genética de *Agrobacterium* (P. Liu and Nester 2006; W. Y. Hwang et al. 2013). El ácido indolacético (IAA) es una auxina que se sobreproduce después de la integración de T-DNA, puede afectar el crecimiento y la expresión de los genes *vir* ya que compite por los compuestos fenólicos por la interacción con la proteína VirA. Se propone que bajos niveles de auxinas pueden promover la transformación durante los momentos iniciales de la infección de *Agrobacterium* para evitar la inhibición del crecimiento y los genes de virulencia. Otra respuesta a nivel de planta para inhibir la infección por parte de *Agrobacterium* es la del ácido salicílico, esta citoquinina también interfiere en la virulencia, la unión de la bacteria a la pared de las células y el crecimiento de esta (HWANG et al. 2010). Se ha demostrado el efecto del ácido salicílico, creando plantas mutantes que sobreexpresan esta citoquinina y las hace

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9 resistentes a la infección por parte de *A. tumefaciens*, mientras que plantas con una poca producción tiene un alto porcentaje de infección por parte de *Agrobacterium* (Anand et al. 2008; C. W. Lee et al. 2009). Otro componente que puede afectar la infección en la planta es el etileno, que se ha documentado que puede reprimir la expresión de los genes *vir* pero no representa una amenaza al crecimiento de *Agrobacterium* (Nonaka et al. 2008). En síntesis, un balance adecuado de las hormonas de la planta puede ejercer un rol importante en la modulación de la eficiencia de infección por parte de *Agrobacterium tumefaciens* (Gohlke and Deeken 2014; Subramoni et al. 2014).

3.3.1.4. Transferencia genética Horizontal por *Agrobacterium tumefaciens*

Aunque se conoce a *Agrobacterium* por su capacidad de transferir genes horizontalmente a células de plantas generando la enfermedad de la corona de agallas, se considera que no es un evento exclusivo de esta especie, debido a que existen muchas secuencias de origen bacteriano que se encuentran en muchos genomas eucariotas (B. Lacroix and Citovsky 2018). Muchas de estas secuencias se han adquirido por eventos endosimbióticos que permitió integración de organelas en la célula o simplemente adquisición de genes que fueron relevantes para una evolución adaptativa.

Agrobacterium representa el principal vector usado en la investigación en biotecnología vegetal para la transferencia de genes. Para la década de los 80's se realizó la primera transformación y regeneración exitosa de plantas de tabaco (Horsch et al. 1984), pero, aunque la mayoría de las plantas son susceptibles a una transformación mediante *Agrobacterium*, la eficiencia de la generación de plantas transgénicas sigue siendo baja para muchas de ellas (B. B. Lacroix et al. n.d.)

La transferencia de DNA permite estudiar la expresión genética en muchos tejidos de plantas permitiendo por ejemplo la evaluación de localización subcelular de proteínas (Krenek et al. 2015). Como la integración del T-DNA en muchas ocasiones ocurre de manera aleatoria en el genoma de la planta, permite estudiar genómica por medio de colecciones de plantas con mutaciones por inserciones (Alonso et al. 2003)

Finalmente, aunque se han logrado comprender muchos mecanismos de la transferencia de DNA por parte de *Agrobacterium* a sus hospederos, así como entender el transporte e integración del DNA foráneo al genoma de células eucariotas, aún permanecen muchas incógnitas alrededor de dichos mecanismos, cómo lo es si la introducción de un DNA foráneo en el genoma representa un acto agresivo en contra de la célula y si los organismos eucariotas ya han evolucionado para adaptarse a este tipo de inserciones y mantener la integridad de sus genomas (B. Lacroix and Citovsky 2018).

3.3.1.5. Uso de *Agrobacterium* como herramienta biotecnológica en cultivos

La producción de alimentos a nivel mundial tiene ciertos retos asociados principalmente a un incremento en la población mundial, cambio climático y área limitada para la agricultura en el

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9 mundo (Villanueva-Mejía 2018). La biotecnología vegetal aplicada a la agricultura ha jugado un papel relevante para la producción de cultivos sostenibles, dentro de los principales aportes se resalta la introducción de cultivos que son tolerantes a ataque por insectos y también a herbicidas, cultivos tolerantes a sequía, mayor producción de materia prima por menos área cultivada, entre otros (Anand et al. 2018). Un análisis llevado a cabo por Pellegrino y colaboradores en el 2018 (Pellegrino et al. 2018), tomó datos del uso de cultivos biotecnológicos e indicó que a nivel mundial se ha disminuido en un 37% el uso de pesticidas y la producción ha aumentado en promedio un 25%. El núcleo de la biotecnología agrícola es la transformación de plantas donde se logra insertar un DNA foráneo en el genoma de las plantas, este proceso se hace principalmente mediado por *Agrobacterium*.

Para muchos cultivos, se necesita una expresión multi generacional de los transgenes, debido a la variabilidad inherente del proceso de integración del transgén al genoma (Strauss and Sax 2016). Es por ello que se hace necesario caracterizar los rasgos transgénicos en muchos eventos realizados sobre múltiples explantes vegetales transformados con el mismo constructo, y así identificar el mejor evento (Strauss and Sax 2016). Para la identificación del mejor evento de transformación se necesitan herramientas a nivel molecular, tales como qPCR (determinación del número de copias del transgen), PCR multiplex (detección de la integración del vector) (Zhi et al. 2015), seguido por Southern-by-Sequencing TM (SbSTM) (Zastrow-Hayes et al. 2015), el cual es usado para determinar de manera exacta la secuencia exacta del inserto, mientras que de manera simultánea se detecta la presencia de DNA exógeno en los eventos de transformación. Una combinación de estos ensayos provee un marco de trabajo robusto para la caracterización y selección de altos porcentajes de eventos de transformación de calidad (Anand et al. 2018). Una práctica común en la industria de los alimentos es solo aceptar los eventos que cumplan con un alto porcentaje de calidad para un análisis fenotípico adicional y el rendimiento en campo. Muchas agencias prefieren también aquellos eventos transgénicos donde no se interrumpen genes endógenos o que tengan un inserto que este en el rango de 1-2 Kbp (“Guidance on the Agronomic and Phenotypic Characterisation of Genetically Modified Plants” 2016).

Es altamente deseable desarrollar estrategias de mejoramiento genético que sean precisas en sitios específicos donde se pueda integrar el transgén, para una integración controlada y evitar interferencias con genes de la planta (Anand et al. 2018). Se han adoptado estrategias para una modificación genética precisa y adicionalmente generar eventos donde no se integren secuencias no deseadas que son altamente reguladas por las compañías alimentarias. Para una modificación genética precisa se resaltan dos métodos: el primero es la integración específica mediada por la recombinasa, el segundo, es la recombinación no homóloga mediada por nucleasas, para insertar un DNA molde al genoma de las plantas (Lyznik et al. 2003, Tzfira and White 2005). Durante los últimos años se ha resaltado el uso del segundo método porque permite un rompimiento en la doble cadena de ADN en un sitio específico del genoma, y luego se hace una entrega de un DNA molde para la recombinación homóloga. Cae un interés particular en el sistema CRISPR/Cas9 porque permite una modificación en el genoma más precisa que la realizada por los ZFNs y TALENs,

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9 además. Se pueden hacer varias modificaciones en simultaneo. La aplicabilidad de estos métodos permanece un poco referenciado a tener bajas eficiencias de transformación (Lyznik et al 2003, Weeks et al 2016, Anand and Jones, 2018).

3.3.1.6. Uso de *Agrobacterium* como sistema de edición genética tipo CRISPR/Cas9 en cultivos

La edición de genomas en las plantas es tan antigua como las plantas mismas, surgiendo como una forma natural de mutagénesis aleatoria. A medida que surgió la domesticación de las plantas, cerca de 10000 años atrás, la selección natural se acercó a ámbitos de mejoramiento de plantas a través de cruces intra e interespecíficos e intergénicos, y esto contribuyó a aumentar la variabilidad genética (Sleper and Poehlman 2006). Tiempo después la manipulación genética se dirigió a la generación de mutaciones mediante rayos X, rayos gamma y beta, irradiación ultravioleta, adicionalmente, mutagénicos químicos como metanosulfonato de etilo (Greene et al. 2003).

Se han reportado durante los últimos años varios estudios de edición de genomas en plantas usando nucleasas con secuencias de reconocimiento, que se pueden resumir en nucleasas dedos de zinc (ZFN), nucleasas activadoras de transcripción (TALENs), repeticiones palindrómicas cortas agrupadas interespaciadas (CRISPR) con la nucleasa Cas9 o Cpf1. Básicamente la edición de genomas se trata de una reparación del DNA basada en la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y reparación dirigida por homología (HDR) (Steinert et al. 2016). La NHEJ, es una vía de reparación donde se unen los extremos del DNA mediante una ligasa, proceso que puede resultar en errores que incluyen inserciones o deleciones (indels) de nucleótidos. Este tipo de errores causa codones de parada prematuros o sin sentido, haciendo genes no funcionales. Por su parte, el tipo de reparación HDR se basa en las recombinaciones homologas que ocurre en células somáticas para reparar el quiebre de la doble cadena, y en células meióticas para el intercambio de material genético entre cromosomas parentales (Puchta 2005, Steinert et al 2016). El resultado de esta vía de reparación es la integración precisa de una cadena de DNA molde que es donada por un cromosoma homólogo.

Para este capítulo en particular, esta investigación se centró en el uso del sistema CRISPR/Cas9, el cual es un componente importante en la inmunidad adaptativa en bacterias y arqueas que está involucrado en la eliminación de DNA plasmídico o viral de parásitos invasores (Bhaya et al. 2011). El sistema CRISPR contiene una combinación de Cas9, elementos RNA no codificantes denominados CRISPR RNA (crRNA) y pequeñas secuencias para transactivaciones crRNA (tracrRNA). El crRNA y tracrRNA forman un complejo denominado RNA (gRNA). La endonucleasa Cas9 forma un complejo con el RNA guía que reconoce una secuencia específica en el sitio target en la presencia de un motivo protoespaciador adyacente corriente abajo (PAM) que tiene una secuencia 5'-NGG-3', secuencias que presentan alta ocurrencia en los genomas, lo que conduce a que muchos genes pueden ser blanco para el complejo Cas9/gRNA (Sardesay y Subhashree, 2018).

Una vez enunciados los principales componentes moleculares de la edición genética, es importante mencionar que este sistema puede ser llevado a las plantas usando para ello la bacteria *Agrobacterium*, mediante el uso de un caset de expresión que lleve a la producción de la endonucleasa Cas9 y el sgRNA, caset que puede estar en un plásmido y entregado por la bacteria (Xing et al. 2014). Lo anterior ha llevado a considerar que *A. tumefaciens* es uno de los métodos preferidos para la entrega del sistema CRISPR/Cas para la edición genética de genomas vegetales, ya que el vector para la entrega del complejo es bastante estable (Sardesay y Subhashree, 2018).

Ahora bien, respecto a la eficiencia del proceso, una edición genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* puede aumentar su eficiencia si se complementan con copias extra de genes *vir*, es decir, usando cepas “supervirulentas”. Merlo y colaboradores (2017) desarrollaron una cepa supervirulenta de la cepa LBA4404 donde integraron genes *vir* en el cromosoma de la bacteria, creando un “SUPERCHROME” que lograba el doble de la eficiencia de transformación (comparada con una cepa LBA4404 *wild type*), y que además era capaz de mantener un 100% la estabilidad del plásmido de interés en su sistema (Gupta et al. 2017). Asimismo, para mejorar el sistema de edición genética, se han realizado avances en la reducción del tamaño del vector (mejorando su estabilidad), generando nuevas opciones sobre el marcador de selección en la bacteria y agregando operones a los genes VirC, VirD, y VirE (Anand et al. 2018).

3.3.2. Sistema CRISPR

Los procariotas tienen mecanismos de defensa para invasiones virales. Una de las más nombradas estos últimos años ha sido un mecanismo de inmunidad adaptativa encontrada en muchas bacterias y arqueas. Se trata de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas, conocida por sus siglas en inglés CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats), mecanismo que consiste básicamente en integrar (guardar) secuencias de DNA en su genoma (de los procariotas), que son idénticas a los patógenos que han invadido anteriormente, lo que genera una especie de memoria celular. Estas secuencias adquiridas permiten a la bacteria o arquea reconocer invasiones virales posteriores y degradar la secuencia invasora por medio de una endonucleasa Cas9 (Bhaya et al. 2013).

3.3.2.1. Generación de los pequeños RNAs

La característica más distintiva del sistema CRISPR/Cas9 es el locus CRISPR. Los CRISPR loci son caracterizados por sus secuencias cortas y repetidas (generalmente 30-40 nucleótidos) que son separados por secuencias variables de tamaños similares, que son las que provienen de los virus, plásmidos u otros invasores y les confieren la inmunidad en contra de estos (Kunin et al 2007). El locus de CRISPR transcribe pequeños RNA (crRNA) que contienen las secuencias derivadas de los invasores como target para su silenciamiento (Brouns et al. 2008, Marraffini y Sontheimer, 2008).

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9
 CRISPR captura y almacena fragmentos de secuencias invasoras y genera pequeños RNAs que confieren la inmunidad heredada en contra de los invasores de las bacterias o arqueas (Lillestol et al 2009)

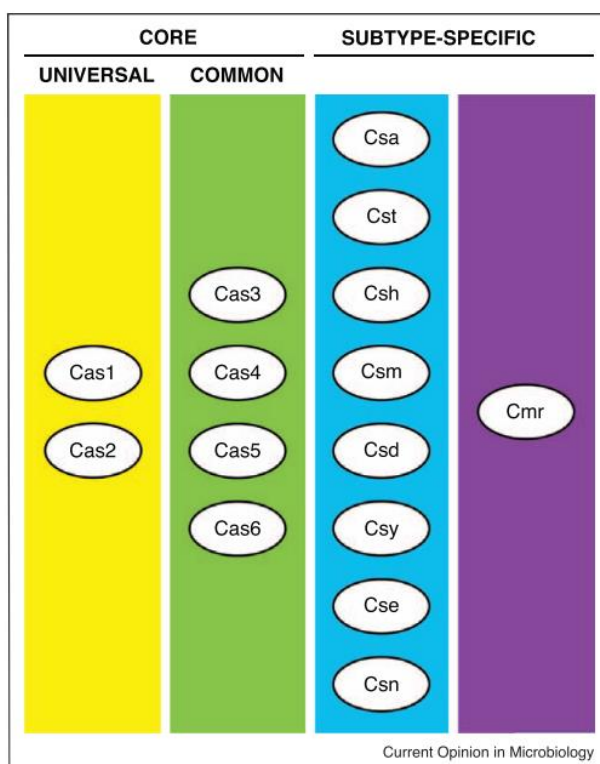
3.3.2.2. Endonucleasas Cas

Los genes *cas* están estrechamente vinculados a los loci CRISPR de manera física (ubicación a nivel genómico) y evolutiva, lo que lo hace coherente con el cofuncionamiento de los crRNAs y las proteínas Cas (Makarova et al. 2011). Existen cerca de 45 familias de genes *cas*, sin embargo, solo se concentra un pequeño número de éstas, como Cas1-6, pero muchos organismos tienen únicamente alguno de estos seis genes, y únicamente las Cas1 y Cas2 parecen ser universales en el mecanismo de defensa de las bacterias y arqueas (Terns and Terns 2014). En los organismos, el centro de los genes *cas* están suplementados por uno o más de los nueve sets de los subtipos de Cas. Ocho de los sets de los genes *cas* son nombrados según un organismo prototipo donde se encuentran (tabla 10, figura 33). Existe otro set que es el Cmr que se denomina modulo RAMP, y se encuentra en conjunto con otros sets.

Tabla 10. Subtipo de los genes Cas y el Organismo dónde se encuentra (Terns and Terns 2014).

Subtipo <i>Cas</i>	Organismo
<i>Csa</i>	<i>Aeropyrum pernix</i>
<i>Cst</i>	<i>Thermotoga</i>
<i>Csh</i>	<i>Haloarcula</i>
<i>Csm</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>Csd</i>	<i>Desulfovibrio</i>
<i>Csy</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Cse</i>	<i>Escherichia</i>
<i>csn</i>	<i>Neisseria</i>

Figura 33. Representación de los tipos de proteína Cas, desde las más universales hasta las más específicas encontradas. Tomada de Terns and Terns 2015.



Lo tipos de Cas: Csa, Cst, Csh y Csm son comunes en arqueas (Makarova et al. 2011, Haft et al. 2005), y todos los tipos de Cas están presentes en bacterias con excepción de Csa, que resulta ser exclusiva para arqueas. La diversidad de las proteínas Cas en los sistemas CRISPR podría sugerir que existen múltiples variaciones de la ruta de ejecución de CRISPR. Las proteínas Cas han demostrado funcionar como nucleasas, helicasas, proteínas de unión al RNA, entre otras funciones (Haft et al. 2005, Makarova 2006), sin embargo aún falta caracterizar muchas de las proteínas a nivel bioquímico.

3.3.2.3. Mecanismo de acción del sistema CRISPR Cas en procariotas

Durante el proceso de inmunidad adquirida que permite CRISPR, se contemplan 3 pasos de operación, el primero es adaptación de los CRISPRs, el segundo en la biogénesis de los RNAs de CRISPR y finalmente es el silenciamiento de los invasores (Terns and Terns 2014) tal y como lo muestra la figura 34.

- Adaptación: Adquisición de las secuencias del nuevo invasor en el loci CRISPR

Durante esta primera fase, una copia de un fragmento del ácido nucleico del patógeno invasor se genera y se denomina “protoespaciador” y este se integra al locus CRISPR. Estos

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9

protoespaciadores se integran adyacente a la secuencia líder en un extremo del CRISPR (Barrangou et al. 2007; Andersson and Banfield 2008), lo que hace se las inserciones sean en cierta media “cronológicas” con respecto a infecciones pasadas. Secuencias cortas de 3-6 nucleótidos se encuentran adyacentes al protoespaciador, a estas se les denominan PAMs (Deveau, Garneau, and Moineau 2010) y son críticas en la generación o la integración de los protoespaciadores al loci CRISPR (Horvath et al. 2008). La región PAM es reconocida por la maquinaria para su corte por la endonucleasa respectiva. Para la escisión del DNA del invasor se la ha adjudicado relevancia a la Cas1 por evidencias a nivel *in vitro* (Wiedenheft et al. 2011).

- Biogénesis de los RNA CRISPR (crRNA)

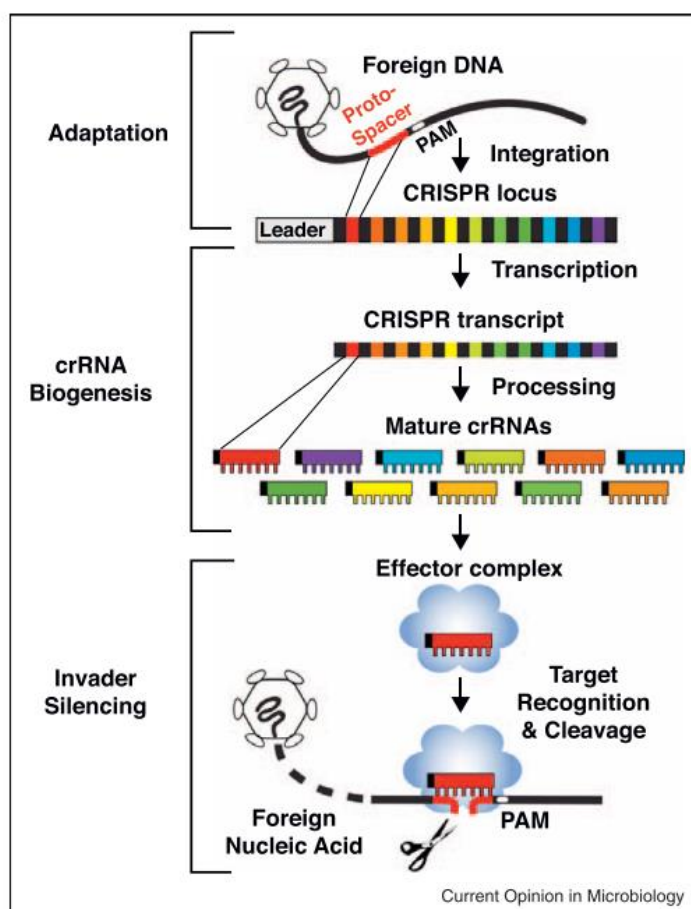
La biogénesis implica la producción de numerosos crRNA individuales a partir de transcripciones del locus CRISPR (Hale et al. 2009; Marraffini and Sontheimer 2008). En varios organismos se ha evidenciado de los crRNA y las proteínas Cas se expresan de manera constitutiva, lo cual es coherente para un sistema inmune. También estudios realizados en *E.coli* han mostrado que la expresión de los crRNA están altamente regulados (Díez-Villaseñor et al. 2010) y que en *Thermus thermophilus*, la presencia de invasores eleva la expresión de los crRNAs (Agari, Kuramitsu, and Shinkai 2010)

Se han logrado identificar las primeras enzimas implicadas en la biogénesis de los crRNA. En varios sistemas CRISPR-Cas, la superfamilia RAMP de las proteínas Cas cataliza el corte de los transcritos de CRISPR, las Cas reconocen repeticiones específicas de secuencias crRNA y cataliza un único corte dentro de cada repetición, lo que libera crRNA individualmente (Carte et al. 2008) y que su secuencia está flanqueada por 5' y 3'. Una secuencia repetida de 8 nucleótidos se retiene al extremo 5' de los crRNA lo que representa una especie de etiqueta que juega un papel importante en el sitio de unión de la proteína Cas (Carte et al. 2008).

- Silenciamiento de los invasores

Los crRNAs son incorporados en complejos efectores y guían dichos complejos al genoma del invasor (por medio de interacciones de pares de bases). El silenciamiento puede ser ejecutado a nivel de DNA o RNA. Cuando se transcribe el crRNA, un segundo RNA es transcrito (se trata de otro RNA que se encuentra corriente arriba del locus de CRISPR), RNA denominado trans-activador CRISPR RNA (tracrRNA). El tracrRNA tiene una región que es complementaria a la región repetida del crRNA y crea un RNA de doble cadena que es cortado por la RNasa III y resulta en un complejo de crRNA:tracrRNA que se asocia con una proteína Cas y crea una ribonucleoproteína activa que va a realizar el corte en el genoma del invasor (Thurtle-Schmidt and Lo 2018).

Figura 34. Esquema que representa el mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas en procariotas. Tomado de (Terns and Terns 2014)



3.3.2.4. Uso del sistema CRISPR/Cas9 en la biotecnología vegetal

Las plantas están expuestas a muchas condiciones biológicas y ambientales que pueden causar daños a nivel del DNA, como lo es la radiación UV, infección por patógenos, estreses genotóxicos, calor, entre otros. Este tipo de daños deben de ser reparados para mantener la estabilidad del genoma, y para ello, existen diferentes maquinarias de reparación del DNA. Para la reparación de pares de bases y nucleótidos dañadas existe la reparación por escisión de bases (BER) y la reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Mali et al. 2013). El reconocimiento y corrección de nucleótidos mal incorporados se realiza por el mecanismo de reparación de mismatch (MMR), mientras que el reconocimiento y reparación de rompimientos de una sola cadena o nicks se reparan por la vía BER y reparación directa homologa (HDR) - si existe algún donador homologo- Para el caso de daños de rompimiento de la doble cadena del ADN, existen dos vías de reparación: la de unión de extremos no homólogos (NHEJ) y recombinación homologa (HR) (Jinek et al. 2012, 2013). Se cree que NHEJ resulta en varias mutaciones, variando desde unas sustituciones, hasta

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9 inserciones/deleciones de un solo nucleótido (Roth and Wilson 1985). Por el contrario, HR, aunque generalmente se cree que está libre de errores de reparación, con frecuencia resulta en grandes duplicaciones segmentarias, duplicación de genes, pérdida o inactivación génicas (J. Smith 2001)

Por un largo tiempo la inducción de cambios a nivel genómico estaba supeditado a las propiedades de las herramientas que estaban disponibles para edición genética. Ahora, el sistema CRISPR asociado a la endonucleasa Cas9 CRISPR/Cas9 ha revolucionado la investigación y mejoramiento genético en plantas, dado que combina una alta eficiencia y una flexibilidad potencializada con la facilidad de hacer modificaciones simultáneamente en múltiples sitios del genoma (Schindele, Dorn, and Puchta 2020). El sistema CRISPR/Cas9 se divide en dos clases con 6 tipos. La clase 1 contiene los sistemas CRISPR de tipo I y tipo III y son comúnmente encontrados en arqueas. La clase 2 contiene los tipos II, IV y V.

La nucleasa Cas9 tipo II de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) fue la primera en ser utilizada para aplicaciones biotecnológicas en 2012 y usada para generar la primera planta editada en 2012 (Jinek et al. 2012; Shan et al. 2013). De igual forma, se han empleado otros tipos de fuentes para Cas9, como *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9) o *Streptococcus thermophilus* Cas9 (StCas9). Asimismo, otros sistemas CRISPR se han caracterizado como el CRISPR/Cas12a con requerimientos diferentes en su sgRNA y patrones de corte, así como el CRISPR/Cas13, que puede tener como target RNA en lugar al DNA (Zetsche et al. 2015; Shmakov et al. 2015). CRISPR/Cas9 realmente se ha visto extensamente usado para la generación de knockouts, permitiendo la introducción de nuevas características a cultivos y a nivel de investigación permite análisis fenotípicos de mutantes en biología de plantas (Kumlehn et al. 2018).

CRISPR es un poco más eficiente y sencillo que métodos previos de edición genética como ZFNs y TALENs. Estos últimos, a pesar de ser similares a CRISPR en la manera de que pueden generar doble quiebre del DNA en una región objetivo, realmente acarrear una ingeniería a nivel proteína más desgastante para cada una de las regiones blanco; aspecto opuesto en CRISPR, ya que éste utiliza el RNA guía. Para resaltar, la habilidad de CRISPR para ser usado en reacciones multiplex logrando múltiples targets de manera simultánea, aspecto considerado una de las mayores ventajas comparado con ZFNs y TALENs (Hsu et al. 2013).

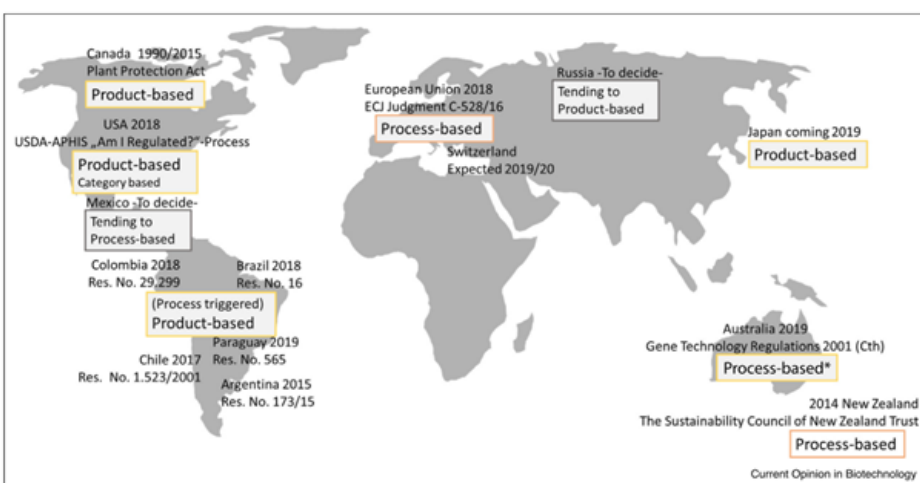
CRISPR tiene varios campos de acción ya que tiene muchas aplicaciones en fitomejoramiento. Una revisión de 52 artículos sobre la aplicación agronómica de CRISPR muestra que el mayor rango de aplicación de esta tecnología es a nivel de mejoramiento de rendimiento en cultivos, seguido de biofortificación y tolerancia a herbicida (Ricroch, Clairand, and Harwood 2017). Para los fitomejoradores, CRISPR es una gran herramienta para desarrollar características deseadas en diferentes especies de plantas y en cierta medida resulta ser más ágil, en comparación al fitomejoramiento tradicional que involucra cruce de germoplasmas que puede tomar años para mejorar una especie.

3.3.2.5. Uso del sistema CRISPR como herramienta biotecnológica en cultivos

La aplicación de la edición genética en plantas usando nucleasas a un sitio específico, ha fomentado la investigación básica en plantas y a su vez, el fitomejoramiento y aplicaciones comerciales (Metje-Sprink, Sprink, and Hartung 2020). Gracias a la alta facilidad y eficiencia del uso de esta tecnología, al menos 40 especies de plantas se han modificado durante estos años (Tian et al. 2017; Lemmon et al. 2018; Modrzejewski et al. 2019), lo que ha aumentado el número de publicaciones científicas que reportan el uso de CRISPR, casi que de manera exponencial en aplicaciones biotecnológicas. Vale la pena resaltar, que un aspecto importante para el uso de herramientas de edición genética, como CRISPR, conlleva asuntos legales que regulan su uso. Para mencionar un par de casos, la corte de justicia de la unión europea en Julio del 2018 decidió que las plantas producidas por nuevos métodos de mutagénesis directa (como es el caso de CRISPR) deben ser reguladas como Organismos Genéticamente Modificados (GMO) (Caso C-258/16) (Ver Figura 35), lo que implica que cualquier investigación que involucre edición genética debe pasar por un proceso legal con las autoridades competentes. Caso contrario se ve en Estados Unidos y países de Sur América como, Argentina, Brasil, Colombia, y Chile que denotan que las plantas que son sometidas a edición genética no se someten a regulación como si fueran GMO, siempre y cuando, al final del proceso no queden secuencias transgénicas en las plantas resultantes (Metje-Sprink, Sprink, and Hartung 2020).

Figura 35. Panorama mundial de las regulaciones de cultivos basados en edición genética. Tomado de Metje-Sprink, Sprink, and Hartung 2020

Figure 1



Ahora bien, a nivel de investigación en plantas, son muchos los cultivos que están siendo mejorados mediante edición genética como lo muestra la tabla 11. Aquí se observa que el arroz es el cultivo que más se ha estudiado para mejorar características agronómicas.

Tabla 11. Cultivos de plantas editadas genéticamente que se han evaluado en campo. Tomada de Metje-Sprink, Sprink, and Hartung 2020

Plant/country	Trait	Agronomic performance	Reference
Rice - nd	Storage tolerance	nd	[17]
Rice - China	Enhanced grain size and number, more dense and erected panicles;	Better as control	[5]
Rice - China	Enhanced blast resistance	Normal	[18]
Rice - China	Early flowering/maturing	Growth inhibition in multiple knockouts	[19]
Rice - Japan	Low Cs + plants	nd	[20]
Rice - China	Multiplexing of quantitative traits	Diverse	[6]
Rice - China	Low Cd-accumulating plants	Normal	[21]
Rice - China	Immune response	Dwarfed plants	[22]
Rice - China	Grain size	Normal	[23]
Rice - China	Grain yield	Better as control	[24]
Rice - China	Grain weight and altered protein content	Better as control	[25]
Rice - China	Waxy rice	Normal	[26]
Rice - China	Disease resistance	Normal	[7,27,28]
Rice - China	Knockout amino acid transport ('proof of concept')	Growth inhibition, yield reduction	[29]
Rice - China	Negative effect on grain architecture	Thinner and lighter grains	[30]
Rice - China	Salt tolerance in greenhouse, no salt tolerance in field observed	Normal	[9]
Rice - China	Higher grain number, higher 1000-grain weight;	Better as control	[8]
Rice - China	Early heading but yield loss	Better in se14-mutant	[10**]
Tomato - USA	Self pruning, early flowering,	lower total yield as control	[12]
Tomato - China	Shelf life	Normal	[31]
Tomato - USA	Control of fruit size	nd	[13]
Rapeseed - China	Multilocular siliques	nd	[32]
Camellina - England	Altered oil composition	Severe dwarfing in FAD2 triple knockout	[33,34]
Maize - USA	Increased grain yield under drought stress	Better as control	[11]
Peanut - China	Altered oil composition	Slight decreased pod number	[35]
Sugarcane - USA	Saccharification behavior	Normal	[16**]
Wheat - Belgium		nd	VIB

Evidencias han demostrado una rápida expansión del sistema Crispr/Cas9 en diversas variedades de cultivos, incluyendo los cultivos tropicales, ya que la edición de genomas ha mostrado ser una gran promesa para los cultivos y la alta demanda de alimentos a nivel mundial (Haque et al. 2018). Dentro de los estudios de edición genética, el cultivo del arroz es el que más se ha estandarizado, puesto que es uno de los cereales más cultivados en el mundo en climas tropicales (tabla 11).

A pesar de que muchos genomas de varias plantas de cultivos tropicales se han secuenciado, las funciones de la mayoría de los genes siguen siendo desconocida, lo que quiere decir que no se ha alcanzado el nivel de investigación para comprender completamente las funciones de la mayoría de los genes de las plantas tropicales. Sin embargo, la reciente tecnología de secuenciación del genoma y los estudios de asociación del genoma (GWAS), permiten predecir la función de muchos genes, lo que expande la aplicación del sistema Crispr/Cas9 a varios cultivos (Tabla 12 y 13)

Tabla 12. Ejemplos de cultivos tropicales que han sido editados genéticamente mediante CRISPR, para desarrollo de tolerancia a estrés biótico y abiótico. Tomada de Haque et al. 2018.

Crop	Target gene(s)	Target traits	Type of edit	Results	References
Banana	Phytoene desaturase	Trial for CRISPR	Gene disruption	Decreased chlorophyll and total carotenoid contents	Kaur et al., 2017, 2018
Cassava	Phytoene desaturase	Trial for CRISPR	Gene disruption	Observation of albino phenotype	Odiro et al., 2017
Cassava	eIF4E isoforms <i>nCBP-1</i> & <i>nCBP-2</i>	Resistance to cassava brown streak disease	Gene disruption	Elevated resistance to cassava brown streak disease	Gomez et al., 2017
<i>Theobroma cacao</i>	<i>TcNPR3</i> , a suppressor of the defense response	Resistance to the cacao pathogen <i>Phytophthora tropicalis</i>	Gene disruption	Increased resistance to infection with the cacao pathogen <i>Phytophthora tropicalis</i>	Fister et al., 2018
Cotton (<i>Gossypium hirsutum</i>)	CLCuD IR and Rep regions	Resistance to cotton leaf curl disease	Viral gene disruption	Targeted cleavage of mixed infections by multiple viruses and associated DNA satellites, such as CLCuD-complex	Iqbal et al., 2016
Rice	<i>OsSWEET11</i> , <i>OsSWEET14</i> (rice bacterial blight susceptibility genes)	Resistance to bacterial blight	Promoter disruption	The promoter of the blight susceptibility gene was disrupted	Jiang et al., 2013
Rice	<i>OsERF322</i> (ethylene responsive factor transcription factor)	Resistance to rice blast	Gene disruption	Resistance to <i>M. oryzae</i> was enhanced	Wang et al., 2016
Wheat	<i>TaMLO-A1</i> , <i>TaMLO-B1</i> and <i>TaMLO-D1</i>	Resistance to powdery mildew	Gene disruption	The number of mildew microcolonies formed on the leaves was significantly reduced against the control and no apparent fungal growth was observed on the leaves of edited plants	Wang et al., 2014
Wheat	<i>TaDREB2</i> and <i>TaERF3</i>	Trial for CRISPR	Gene disruption	Provide a deep insight about their functioning in abiotic stress response	Kim et al., 2018

Tabla 13. Genes de plantas tropicales que han sido editados genéticamente mediante CRISPR, para desarrollo de tolerancia a estrés biótico y abiótico. Tomada de Haque et al. 2018.

Crop	Target gene(s)	Target traits/stress	References
Avocado	<i>PAL</i> and <i>LOX</i>	Anthracnose disease resistance	Bill et al., 2017
Avocado	<i>PaNPR2</i> and <i>PaNPR4</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i> resistance	Backer et al., 2015
Banana	<i>MaSWEET-1a</i> , <i>MaSWEET-4b</i> , <i>MaSWEET-14b</i> , <i>MaSWEET-4c</i> , <i>MaSWEET-14c</i> , <i>MaSWEET-4d</i> , <i>MaSWEET-14d</i> , and <i>MaSWEET-14h</i>	Foc 4 TR4 and abiotic stresses (cold and salt) resistance	Miao et al., 2017a
Banana	<i>MaATG8s</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc) resistance	Wei et al., 2017b
Banana	<i>Hrap</i> , <i>Pfip</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>musacearum</i> resistance	Tripathi et al., 2010, 2014; Namukwaya et al., 2012
Banana	<i>MaAPS1</i> and <i>MaAPL3</i>	Abiotic stresses (cold and salt) and <i>Fusarium Oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> (Foc) Tropical Race 4 (TR4) resistance	Miao et al., 2017b
Cassava	<i>RXam1</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> (<i>Xam</i>) strain-specific resistance to <i>XamC10136</i>	Diaz Tatis et al., 2018
Cassava	<i>MeWRKY20-MeATG8a/8f/8h</i> (<i>MeATG8a</i> , <i>MeATG8f</i> , <i>MeATG8h</i>)	Cassava bacterial blight (CBB), caused by <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> (<i>Xam</i>) resistance	Yan et al., 2017
Cassava	<i>MeDELLAs</i>	Cassava bacterial blight (CBB) resistance	Li et al., 2018
Cassava	<i>MebZIPs</i> (<i>MebZIP3</i> and <i>MebZIP5</i>)	Cassava bacterial blight (CBB) resistance	Li X. et al., 2017
Cassava	<i>MeRAV1</i> and <i>MeRAV2</i>	Cassava bacterial blight (CBB) resistance	Wei et al., 2017a
Cassava	<i>MeKUPs</i>	Abiotic stresses (salt, osmosis, cold, drought) resistance	Ou et al., 2018
Cassava	<i>MeMAPKKK</i>	Abiotic stress (drought) resistance	Ye et al., 2017
Coconut	<i>PT15</i>	Root wilt disease (RWD) resistance	Verma et al., 2017
Coconut	<i>NBS-LRR</i> type <i>RGAs</i>	Coconut root (wilt) disease resistance	Rajesh et al., 2015
Cotton	<i>GhPIN1-3</i> and <i>GhPIN2</i>	Abiotic stress (drought) resistance	He et al., 2017
Cotton	<i>GhRDL1</i>	Abiotic stress (drought) resistance	Dass et al., 2017
Cotton	<i>GhERF-IIb3</i>	Bacterial blight caused by <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>malvacearum</i> (<i>Xcm</i>) resistance	Cacas et al., 2017
Date palm	<i>Pdpcs</i> and <i>Pdmt</i>	Abiotic stress (Cd and Cr) resistance	Chaâbene et al., 2018
Date palm	<i>Pdpcs</i> and <i>Pdmt</i>	Abiotic stress (metals) resistance	Chaâbene et al., 2017
Papaya	<i>CpDreb2</i>	Abiotic stresses (drought, heat and cold) resistance	Arroyo-Herrera et al., 2016
Papaya	<i>CpRap2.4a</i> and <i>CpRap2.4b</i>	Abiotic stresses (heat and cold) resistance	Figueroa-Yañez et al., 2016
Sugarcane	<i>ScGluA1</i>	Smut (<i>Sporisorium scitamineum</i>) resistance	Su et al., 2013
Sugarcane	<i>ScCAT1</i>	Smut (<i>Sporisorium scitamineum</i>) resistance	Su et al., 2014
Sugarcane	<i>ScAPX6</i>	Abscisic acid (ABA), methyl jasmonate (MeJA), and copper (Cu) stress resistance	Liu et al., 2017
Sugarcane	<i>ScGluD2</i>	Smut and abiotic stresses (salt and heavy metal) resistance	Su et al., 2016
Sugarcane	<i>ScChlV1</i> and <i>ScChlV11</i>	Smut (<i>Sporisorium scitamineum</i>) resistance	Su et al., 2015
Sugarcane	<i>ScNLSLTP</i>	Abiotic stresses (drought and chilling) resistance	Chen Y. et al., 2017

3.4. Materiales y métodos

El presente proyecto de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología vegetal y el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.

Este capítulo comprende el uso de dos metodologías para la aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9. En una primera parte se contempla el uso de *Agrobacterium tumefaciens* como mediador para la entrega del vector de expresión de tipo CRISPR/Cas9. En la segunda parte se aborda la edición genética haciendo uso de transfección de protoplastos con la Ribonucleoproteína mediada por PEG-4000

3.4.1. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en epicótilos de *Ricinus communis* para la edición genética del gen FAD2.

En primer lugar, se prepararon células quimicompetentes con el método descrito por Hanahan 1983. El medio dónde se conservó *Agrobacterium* (medio YEP) estaba compuesto por Bactopectona 10g/L, NaCl 5g/L y extracto de levadura 10 g/L.

Inicialmente, se inoculó 10 ml de medio YEP con rifampicina (60 ug/ml) y estreptomina (50ug/ml) con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Luego se dejó a 28°C y 220 rpm durante toda la noche. Al día siguiente se tomó los 10 ml como pre-inóculo para 50 ml de medio YEP con los mismos antibióticos y se dejó creciendo toda la noche con las condiciones anteriores. Finalmente, se midió la OD₆₀₀ y se estableció en el rango de 0.5 – 0.7. Para la preparación de células quimicompetentes, se inoculó 100 ml de medio YEP con 1 ml de células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 con la OD₆₀₀ descrita en el apartado anterior, luego se dejó creciendo toda la noche a 28°C a 225 rpm. Al siguiente día se transfirió 15 ml del cultivo inoculado a tubos falcón, para ser centrifugados a 3160 x g durante 7 min a 4°C y se descartó el sobrenadante (después de esta centrifugación, todos los pasos se hacen en cadena de frío, incluyendo puntas y micropipetas frías). El pellet se resuspendió en 10 ml de buffer CCMB80 (Acetato de potasio (pH 7.0) 10 ml/L, CaCl₂·2H₂O 11.8 g/L, MnCl₂·4H₂O 4 g/L, MgCl₂·6H₂O 2 g/L y glicerol 10%. Prepararlo en agua milli-Q, ajustar el pH a 6.4 con 0.1 M de HCl y esterilizar por filtración a 0.45 µm), se agitó en vortex hasta diluir el pellet y luego se agregó 20 ml del mismo buffer y se mezcló por inversión, después se centrifugó a 3160 x g durante 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 10 ml de buffer CCMB80 y hacer vortex, realizar esta última centrifugación una vez más con 10 ml de CCMB80, finalmente el pellet resultante se resuspendió en 800 µl de buffer CCMB80 con puntas pre-enfriadas y se le hizo un pequeño vortex. Las células se almacenaron en alícuotas de 50 µl en tubos eppendorf de 1.5 ml pre-enfriados y se dejaron a -80°C hasta su uso.

3.4.1.1. Transformación *Agrobacterium tumefaciens* con el vector CRISPR PL

Después de la preparación de las células de *Agrobacterium* quimiocompetentes, éstas se transformaron mediante choque térmico con el plásmido CRISPR PL. Inicialmente se descongelaron dos viales que contenían alícuotas de 50 μ L de células competentes de *Agrobacterium* LBA4404 y se dejaron en hielo. A cada uno de los viales que contenía las células quimiocompetentes, se le agregó 5 μ L del plásmido CRISPRPL-1ea (Se hicieron dos transformaciones uno con el plásmido CRISPR 27 y otra con CRISPR 79) (20 ng/ μ L) y se mezcló suavemente con la punta de la micropipeta por 10 veces, luego se puso la mezcla que contiene las células con el vector en hielo por 30 minutos, inmediatamente después de los 30 min se pasaron los viales a 37°C por 1 minuto 20 segundos y se dejaron nuevamente los viales en hielo y se le agregó 250 μ L de medio YEP para la recuperación de las células después del choque térmico, se dejaron por 2 horas a 28°C a 220 μ L en shaker (marca thermo fisher). Finalmente, se sembró 100 μ L de las células en medio YEP sólido con el antibiótico de selección (Kanamicina 50 μ g/ml). Para verificar si las células de *Agrobacterium* quedaron transformadas con el plásmido CRISPRPL, se realizó PCR a las colonias que crecieron en el medio YEP sólido con kanamicina (50 μ g/ml) para la amplificación del gen de resistencia a Higromicina que tiene el plásmido (Ver tabla 15 para secuencia de primers para el gen de resistencia higromicina *HptII*), usando la mezcla de reactivos enunciados en la Tabla 14.

Tabla 14. PCR de colonias de *Agrobacterium tumefaciens* para amplificación de gen de resistencia a Higromicina (*HptII*).

	Concentración Stock	Concentración final
Buffer Taq	10 X	1 X
MgCl ₂	25 mM	3 mM
dNTP's	10 μ M	0.3 μ M
Primer F	10 μ M	0.2 μ M
Primer R	10 μ M	0.2 μ M
Taq	5 U/ μ l	1 U
DNA	---	colonia
H ₂ O	Ajustar a 25 μ l x reacción	

Posteriormente, las muestras fueron incubadas en un termociclador (Bio Rad C1000) con las siguientes condiciones de PCR: 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, annealing 65°C por 1 minuto, polimerización a 72°C por 1 minuto, seguido por 72°C por 5 minutos. Luego los productos de PCR generados fueron corridos en gel de agarosa al 1.2%, a 70 voltios por 90 minutos.

3.4.1.2. Protocolo Transformación de plantas de *R. communis* con *Agrobacterium*

Después de tener las células de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 transformadas con cada una de las dos opciones de plásmidos CRISPR PL (uno para cada opción de sgRNA), se procedió a iniciar el procedimiento de co-cultivo (transformación genética en los tejidos vegetales). Inicialmente, se preparó una solución de infección la cual contiene *Agrobacterium*. Para esto se inoculó 10 ml de medio YEP con 500 μ l de células de *Agrobacterium tumefaciens* que contenían el plásmido CRISPR. Se hicieron dos soluciones de infección: una con el vector CRISPR 27 y otra con CRISPR 79, las cuales se incubaron en agitación a 225 rpm, 28°C por 12 horas. El cultivo precrecido se utilizó como inóculo para 50 ml de medio YEP suplementado con 200 μ M de acetosiringona y se incubó a 28°C, 225 rpm durante toda la noche. Al día siguiente el cultivo se centrifugó a 2000 rpm, 10 min a 25°C, y el pellet se resuspendió con 15 ml de medio WPM (2.41 g/L) (Lloyd and McCown 1980). Una vez esto, el medio se centrifugó nuevamente con las condiciones anteriores, y posteriormente el pellet celular se resuspendió con medio WPM hasta alcanzar una OD_{600} = 0.3 – 0.5 y una vez fijada la densidad óptica. Se adicionó acetosiringona a una concentración final de 200 μ M.

Al momento de tener la solución de infección se realizó la segunda parte del proceso, que es la transformación genética de epicótilos de Higuierilla mediante *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 transformada con el vector de CRISPR. Para esto, se tomó una planta de higuierilla *in vitro* de no más de 2 meses de edad y se seleccionó el epicótilo, cortando hojas, ápice y raíz en cámara de flujo laminar, posteriormente se cubrió el explante con papel fixomull (Fixomull® Stretch, BSN medical) estéril formando un cono para después adicionar 50 μ l de la solución de infección, paso de repitió al siguiente día. Se dejaron los epicótilos en co-cultivo con la solución de infección en oscuridad a 28°C en el medio de regeneración de epicótilos (ver sección 1.4.9.3). Al tercer día del co-cultivo se retiró el papel fixomull y se limpió el explante con un algodón estéril, luego, se formó con papel fixomull estéril un cono nuevo y se agregó 100 μ l del antibiótico Timentin (PhytoTechnology Laboratories®) al 0.1%. Los explantes se dejaron en condiciones controladas (humedad, temperatura y fotoperiodo natural) y establecidas para el cultivo de higuierilla en el laboratorio de biotecnología vegetal de la universidad EAFIT. Transcurridas dos semanas, se retiró el papel fixomull y los epicótilos se pusieron en un nuevo medio de selección, pero esta vez con 20 mg/L de Higromicina. Se dejaron las plantas nuevamente bajo las condiciones del laboratorio de biotecnología vegetal.

3.4.1.3. Identificación Molecular de las plantas transformadas de *R. communis*

Los epicótilos regenerados de *R. communis* se procesaron para extraer RNA y realizar caracterización de los niveles de expresión del gen FAD2. Para esto se usó un kit de extracción de RNA para plantas (Spectrum™ Plant Total RNA, Sigma-Aldrich, USA), después ese se generó cDNA a partir del RNA extraído de las muestras, y así, evaluar los niveles de expresión del gen

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9 de interés. Para ello, se utilizó la técnica de qPCR y posteriormente, con los datos obtenidos de expresión relativa, se procesaron mediante el uso del software HRM (High resolution melt analysis) para el análisis de las curvas de melting de los fragmentos de DNA amplificados durante la qPCR, de tal manera que permitiera identificar diferencias de las plantas “wild type” con respecto a las plantas sometidas a transformación mediada por *Agrobacterium* con el vector de Crispr/Cas9. En la tabla 15 se resumen los primers utilizados durante la identificación molecular de las plantas transformadas de *R. communis*.

Tabla 15. Lista de primers empleados para la identificación molecular de las transformaciones en *Agrobacterium tumefaciens* y *Ricinus communis*.

Nombre primer	Forward	Reverse
HptII	CTATTTCCTTTGCCCTCGGACG	ATGAAAAAGCCTGAACTCACCCG
106 (regiones edición con CRISPR/Cas9)	GTGGAACGATGGGTGCTGGT	ATCGCTTGAAACAATGAGGTGGG
Ubiquitina	CGCAAATACAACCAAGACAAGA	CCAGCAAGCACTCTCCATCA

3.4.1.3.1. Extracción de RNA de epicótilos de *R. communis*

Todos los morteros, pistilos y cristalería se lavaron con agua DEPC y SDS 10% y fueron autoclavados, para eliminar al máximo grado las posibles RNAsas presentes. Ahora bien, para la extracción de RNA, se empleó el kit Spectrum™ Plant Total RNA de Sigma-aldrich, usando para ello hasta 50 mg de muestras (epicótilos de las plantas), los cuales fueron macerados en nitrógeno líquido hasta formar un macerado muy fino, usando mortero y pistilo. Luego se siguieron las recomendaciones del fabricante.

3.4.1.3.2. Preparación cDNA a partir de muestras de RNA de epicótilos de *R. communis*

Para la formación del cDNA a partir del RNA obtenido de epicótilos de plantas de Higuerilla, se empleó el kit QuantiNova™ Reverse Transcription Kit (Qiagen, Germany). Se utilizó para cada muestra 1 µg como template, teniendo la precaución de hacer todas las reacciones en hielo para reducir el riesgo de la degradación del RNA. El procedimiento constó de dos partes: la primera fue la reacción de eliminación de gDNA que pudiera existir en la muestra y la segunda fue la reacción de retrotranscripción. Durante este proceso se siguieron las recomendaciones del protocolo del fabricante, además se usó el termociclador (Bio Rad C1000) (ver Tabla 16)

Tabla 16. Protocolo para la preparación de cDNA a partir del RNA extraído de los epicótilos de *R. communis* sometidos a transformación mediada por *Agrobacterium*.

Paso	Tiempo	Temperatura	Notas
Eliminación del gDNA	2 minutos	45°C	
	Pausa	25°C	Tomar las muestras y ponerlas en hielo. Adicionar los componentes para la retrotranscripción
Reacción de transcripción reversa			Después de adicionar los componentes para la RT poner las muestras en el termociclador
Annealing	3 minutos	25°C	
Retrotranscripción	10 minutos	45°C	
Inactivación de la retrotranscripción	5 minutos	85°C	

3.4.1.3.3. Amplificación del gen FAD2 en qPCR Real Time

Las reacciones de qPCR fueron realizadas en CFX96 de Bio-Rad. La reacción de PCR constaba de 3 µl de cDNA, 0.3 µM de cada primer y SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix Master Mix (BIO-RAD) en un volumen final de 15 µl. Los análisis de curvas de melting se realizaron inmediatamente después de terminarse la RT-qPCR para detectar dimerización de primers y amplificación de productos no específicos. Cada una de las muestras se evaluaron por duplicado, incluyendo controles sin muestra. El gen de Ubiquitina fue empleado como control housekeeping para los experimentos. Las condiciones fueron 95°C por 2 minutos seguido por 40 ciclos a 95°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, 40 ciclos. Las muestras se procesaron en tres corridas independientes de PCR. Adicionalmente, se adicionó una curva de melting entre 45°C a 95°C con incrementos en 0.2°C por 10 segundos.

3.4.1.3.4. Análisis de datos qPCR Real Time de la amplificación del gen FAD2 de epicótilos de *R. communis*

En el software CFX Maestro de Bio-Rad, se ajustaron los datos de cuantificación de nuestras muestras a cuantificación relativa para poder cuantificar la expresión del gen FAD2 en plantas editadas con CRISPR/Cas9 con respecto a la cuantificación relativa de una muestra control, que en este caso son plantas “wild type” (no editadas). Adicionalmente, se realizó un análisis con el software HRM (High resolution melt analysis) de Bio-Rad, donde el cluster que se tomó como referencia eran las plantas wild type. Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando One-way ANOVA con un nivel de significancia del 95%.

3.4.1.3.5. Extracción DNA de epicótilos de *R. communis* para Secuenciación

Se eligieron 11 plantas para extracción de DNA (basada en el método CTAB) y posteriormente se amplificaron con el primer 106 para enviar productos de PCR para enviar a secuenciar. Inicialmente se precalentó el CTAB 2X por 20 minutos a 65°C. Así mismo, los epicótilos de las plantas seleccionadas se maceraron con nitrógeno líquido en morteros previamente esterilizados. El tejido macerado fue trasferido a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se agregó 400 µl de CTAB más 4 µl de β-Mercaptoetanol, los cuales fueron homogenizados mediante el uso de vortex. La mezcla se incubó a 65°C por 30 minutos, agitando los tubos por inversión cada 10 minutos, 10 veces. Posteriormente, se agregó 300 µl de Cloroformo, mezclando por vortex por 1 minuto y se centrifugó a 13000 rpm, 15 minutos a 4°C. Luego, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml y se agregó Cloroformo (un volumen equivalente), mezclando por vortex por 1 minuto. Las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm, 15 minutos a 4°C, para luego transferir sobrenadante a otro nuevo tubo de 1.5 ml, al cual se agregó Isopropanol (un volumen equivalente), Se agitó por inversión 10 veces y se almacenó por 2 horas a -20°C o en algunos casos, se dejó toda la noche a -20°C. Después de dejar la muestra el tiempo indicado, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm, 15 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante y se agregó 200 µl de etanol al 70%. Las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm, 10 minutos a 4°C, repitiendo este paso una vez más. Se retiró el sobrenadante y secaron las muestras en el SpeedVac™ (Thermo Scientific) A 45°C por 7 minutos. Finalmente, agregó 50 µl de H₂O libre de nucleasas (Sigma-Aldrich) y se almacenaron las muestras de DNA a -20°C hasta su uso.

3.4.1.3.6. Amplificación del gen FAD2 en plantas de *R. communis* transformadas con *Agrobacterium*

Amplificación de fragmento del gen FAD2 con primer 106 que incluye las dos zonas de edición con el plásmido CRISPRPL. En la figura 28, las flechas rojas indican los primers forward y reverse del primer 106.

Tabla 17. Condiciones para la amplificación de fragmento del gen FAD2 con primer 106 en plantas transformadas.

	Concentración Stock	Concentración final
Buffer Taq	10 X	1 X
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM
dNTP's	10 µM	0.3 µM
Primer F	10 µM	0.2 µM
Primer R	10 µM	0.2 µM
Taq	5 U/ µl	1 U
DNA	---	100 ng
H ₂ O	Ajustar a 25 µl x reacción	

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9

Las condiciones de PCR fueron 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, annealing 60°C por 30 segundos, polimerización a 72°C por 1 minuto, seguido por 72°C por 10 minutos. Luego los productos de PCR obtenidos fueron separados en gel de agarosa al 1.5%, a 70 voltios por 90 minutos.

3.4.2. Transfección Protoplastos de la ribonucleoproteína CRISPR/cas9 mediante PEG-4000

Para el proceso de transfección de protoplastos con la RNP Crispr/Cas9 mediante PEG-4000 se realizó inicialmente una prueba piloto, en donde se pretendía evaluar el método de ingreso de material genético a las células de protoplastos de *R. communis*, para esto se realizó la metodología de transfección haciendo uso de un plásmido de referencia (pCambia 1305.2) y luego se amplificó el gen de resistencia a Higromicina que estaba presente en dicho vector. Este primer ensayo se realizó puesto que las reacciones que se podían hacer con la RNP eran limitadas. Después de estandarizar el ingreso de material genético a los protoplastos, se procedió a realizar la transfección con las RNP con cada una de las opciones de sgRNA diseñadas en el capítulo 2.

3.4.2.1 Ensayo verificación protocolo de transfección mediante PEG-4000

Para la transfección de los protoplastos con la ribonucleoproteína CRISPR/Cas9, se realizó una prueba piloto para verificar la eficiencia de transfección usando PEG 4000, para esto se utilizó el vector pCambia 1305.2 para ser ingresado a los protoplastos de *R. communis*.

Los protoplastos obtenidos en el capítulo 1 se transfirieron a un tubo eppendor de 1.5 ml con una concentración mínima de 1×10^5 y luego se centrifugaron a 1500 rpm (Rotina 380) por 3 minutos, el sobrenadante se eliminó cuidadosamente. El pellet de protoplastos fue resuspendido en 200 μ l de solución MMG (tabla 20), luego se agregó 10 μ l del plásmido pCambia 1305.2 (10-20 μ g) y se mezcló suavemente por inversión, se adicionó 210 μ l de solución PEG (Tabla 19), agregando gota a gota y mezclando suavemente por inversión de los tubos, se incubó la mezcla por 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, después, se adicionó 950 μ l de solución W5 (tabla 18) pre enfriada y se mezcló por inversión, la mezcla de protoplastos con el plásmido se centrifugó a 1500 rpm por 3 minutos y se descartó el sobrenadante, esta última centrifugación se repitió una vez más con 1 ml de solución W5. Finalmente, el pellet de protoplastos se resuspendió en 500 μ l de medio de crecimiento (ver sección 1.4.1.1), se dejó en oscuridad a temperatura ambiente por 48-72 horas hasta hacer evaluación molecular.

Después de las 72 horas de transformación con el plásmido, se tomó una alícuota de 200 μ l de los protoplastos de 200 μ l, los otros 300 μ l de protoplastos se pasaron a 5 ml medio liquido de crecimiento y se dejaron a 60 rpm, a temperatura ambiente y en oscuridad por 5 días.

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9

La alícuota de 200 μ l de protoplastos se centrifugó a máximas velocidades por 5 minutos y se descartó el sobrenadante, luego se adicionó 100 μ l de buffer de extracción (tabla 21), se mezcló por vortex brevemente y se dejó incubando a 60°C por 20 minutos. Posteriormente, se agregó fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y se hizo vortex vigorosamente por 1-2 minutos, se centrifugó a 4°C a máxima velocidad por 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 ml y se adicionó 2 volúmenes (200 μ l) de etanol 100% y se mezcló bien, luego se dejó a -20°C toda la noche. Al día siguiente la mezcla se centrifugó a 4°C a máxima velocidad por 30 minutos, el sobrenadante se removió cuidadosamente, luego, se lavó el pellet con 200 μ l de etanol al 70%, y se centrifugó a 4°C a 13000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante, este último paso se repitió una vez más. Finalmente, el pellet se dejó secar y se resuspendió en 20 μ l de DNase free water.

Tabla 18. Solución de lavado de protoplastos W5

Solución W5

	<i>Concentración Stock</i>	<i>Concentración final</i>
NaCl	3 M	154 mM
CaCl ₂	1 M	125 mM
KCl	0.2 M	5 mM
Mes, pH 5.7	0.2 M	2 mM
Glucosa	0.1 M	5 mM
H ₂ O	---	---

Tabla 19. Solución de transfección que contiene polietilenglicol 4000

Solución PEG

	<i>Concentración Stock</i>	<i>Concentración final</i>
D-manitol	0.8 M	0.2 M
CaCl ₂	1 M	100 mM
PEG 4000	---	40% (p/v)
H ₂ O	---	---

Tabla 20. Solución MMG para resuspender los protoplastos

Solución MMG

	<i>Concentración Stock</i>	<i>Concentración final</i>
Mes	0.2 M	4 mM
D-manitol	0.8 M	0.4 M
MgCl ₂	1 M	15 mM
H ₂ O	---	---

Tabla 21. Reactivos para la extracción de ADN de protoplastos de *R. communis*

Buffer extracción ADN

	<i>Concentración Stock</i>	<i>Concentración final</i>
Tris, pH 8.0	1 M	200 mM
NaCl	5 M	250 mM
EDTA, pH 8.0	0.5 M	10 mM
SDS	10%	0.1%

Después se realizó la caracterización molecular mediante la amplificación del gen *htpII* que confiere resistencia a higromicina y que está en el plásmido pCambia 1305.2

Tabla 22. Condiciones para la amplificación del gen de resistencia a Higromicina (*htpII*) en protoplastos de *R. communis* transformados con plásmido pCambia 1305.2

	<i>Concentración Stock</i>	<i>Concentración final</i>
Buffer Taq	10 X	1 X
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM
dNTP's	10 µM	0.3 µM
Primer F	10 µM	0.2 µM
Primer R	10 µM	0.2 µM
Taq	5 U/ µl	1 U
DNA	---	100 ng
H ₂ O	Ajustar a 25 µl x reacción	

Las condiciones de PCR fueron 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, annealing 65°C por 1 minuto, polimerización a 72°C por 1 minuto, seguido por 72°C por 5 minutos. Posteriormente, los productos de PCR obtenidos fueron separados en gel de agarosa al 1.2%, con 70 voltios por 90 minutos.

3.4.2.2. Transfección de protoplastos de *R. communis* con la ribonucleoproteína CRISPR/Cas9 mediante PEG 4000

Inicialmente se realizó la formación del complejo Ribonucleoproteína (RNP) con cada una de las opciones del sgRNA (Crispr 27 y Crispr 79). Para esto se reconstituyeron cada uno de los sgRNA en TE 1X y se dejaron a una concentración final de 100 μM (100 pmol/ μl). Una vez esto, fueron almacenaron a una temperatura de -20°C hasta su uso. Al momento de realizar los experimentos, los sgRNA se trabajaron a una concentración de 30 pmol/ μl , para esto se tomó 6 μl (180 pmol) del sgRNA que está a una concentración inicial de 30 μM y 1 μl (20 pmol) de la enzima Cas9, 2 μl de NEBuffer 3.1 y 11 μl de H_2O libre de nucleasas, para un total de 20 μl . La mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos para la formación de RNP. La RNP es estable a temperatura ambiente por 1 hora, por una semana a 4°C y por 1 mes a -20°C . En la tabla 23 se muestra las dos opciones que se trabajaron durante la transfección de los protoplastos con la RNP, puesto que se propusieron dos concentraciones de trabajo diferentes para los sgRNA.

Tabla 23. Se hicieron experimentos de transfección de RNP a los protoplastos con las siguientes concentraciones de sgRNA y Cas9

	<i>Ensayo 1</i>	<i>Ensayo 2</i>
sgRNA	240 pmol	180 pmol
Cas9	20 pmol	20 pmol
NEBuffer 3.1	3 μl	2 μl
H_2O	Completar a 20 μl	Completar a 20 μl

Después de obtenido los protoplastos cómo se sugiere en el capítulo 1, se continuó con el proceso de transfección de la ribonucleoproteína mediante PEG-4000. Los protoplastos obtenidos en el capítulo 1 se transfirieron a un tubo eppendor de 1.5 ml con una concentración mínima de 1×10^5 y luego se centrifugaron a 1500 rpm (Rotina 380) por 3 minutos, el sobrenadante se eliminó cuidadosamente. El pellet de protoplastos fu resuspendido en 200 μl de solución MMG (tabla 20), luego se agregó 20 μl de la Ribonucleoproteína (RNP) y se mezcló suavemente por inversión, se adicionó 210 μl de solución PEG (Tabla 19), agregando gota a gota y mezclando suavemente por inversión de los tubos. Posteriormente, se incubó la mezcla por 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, después, se adicionó 950 μl de solución W5 (tabla 18) pre enfriada y se mezcló por inversión. La mezcla de protoplastos con la RNP se centrifugó a 1500 rpm por 3 minutos y se descartó el sobrenadante, esta última centrifugación se repitió una vez más con 1 ml de solución W5. Finalmente, el pellet de protoplastos se resuspendió en 500 μl de medio de crecimiento (ver sección 1.4.1.1), se dejó en oscuridad a temperatura ambiente por 48-72 horas hasta hacer evaluación molecular.

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9

Después de las 72 horas de la transfección con la RNP, se tomó una alícuota de 200 μ l de los protoplastos de 200 μ l, los otros 300 μ l de protoplastos se pasaron a 5 ml medio líquido de crecimiento y se dejaron a 60 rpm, a temperatura ambiente y en oscuridad por 5 días para luego pasar por el cultivo de protoplastos, tal como se realizó en el capítulo 1.

La alícuota de 200 μ l de protoplastos se centrifugó a máximas velocidades por 5 minutos y se descartó el sobrenadante, luego se adicionó 100 μ l de buffer de extracción (tabla 21) y se le hizo vortex brevemente y se dejó incubando a 60°C por 20 minutos, después se agregó fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y se hizo vortex vigorosamente por 1-2 minutos, se centrifugó a 4°C a máxima velocidad por 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 ml y se adicionó 2 volúmenes (200 μ l) de etanol 100% y se mezcló bien, luego se dejó a -20°C toda la noche. Al día siguiente la mezcla se centrifugó a 4°C a máxima velocidad por 30 minutos, el sobrenadante se removió cuidadosamente, luego, se lavó el pellet con 200 μ l de etanol al 70%, y se centrifugó a 4°C a 13000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante, este último paso se repitió una vez más. Finalmente, el pellet se dejó secar y se resuspendió en 20 μ l de DNase free water.

Después se realizó caracterización molecular mediante la amplificación del fragmento del gen FAD2 con los primers 106 del ADN extraído de los protoplastos transfectados con la RNP para cada uno de los sgRNA, estos productos de PCR se enviaron a secuenciar mediante la técnica tipo SANGER en el instituto de genética de la Universidad Nacional de Colombia.

Tabla 24. Amplificación de fragmento 106 que incluye las dos zonas de edición con la RNP en el gen FAD2 en protoplastos de *R. communis*

	<i>Concentración Stock</i>	<i>Concentración final</i>
Buffer Taq	10 X	1 X
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM
dNTP's	10 μ M	0.3 μ M
Primer F	10 μ M	0.2 μ M
Primer R	10 μ M	0.2 μ M
Taq	5 U/ μ l	1 U
DNA	---	100 ng
H ₂ O	Ajustar a 25 μ l x reacción	

Las condiciones de PCR fueron 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, annealing 60°C por 30 segundos, polimerización a 72°C por 1 minuto, seguido por 72°C por 10 minutos.

3.5. Resultados

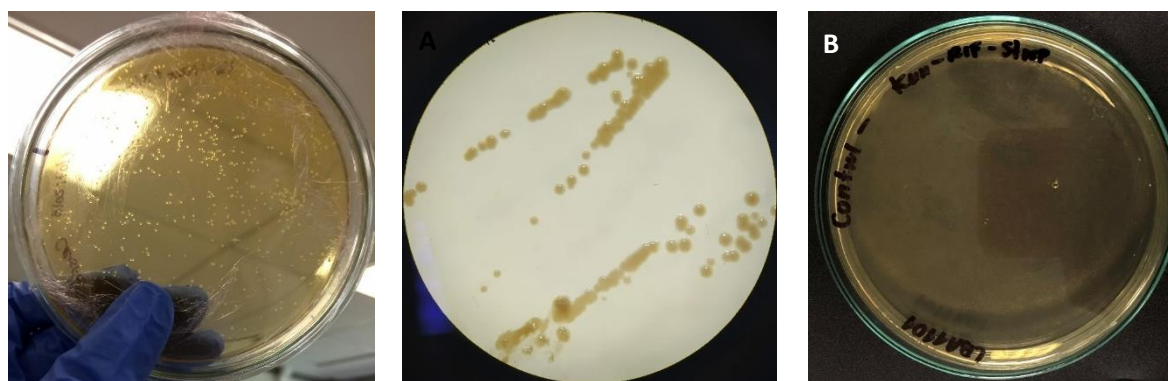
3.5.1. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en epicótilos de *Ricinus communis* para la edición genética del gen FAD2.

En un primer momento se reporta la transformación de *Agrobacterium* con el vector CRISPRPL.

3.5.1.1 Transformación cepa *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404

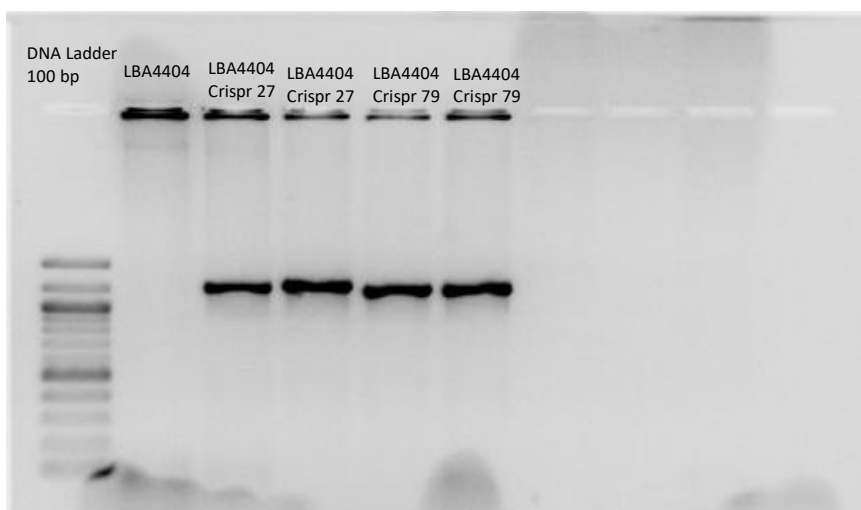
Se llevó a cabo el protocolo de transformación de *Agrobacterium tumefaciens* de la cepa LBA 4404 con el plásmido CRISPR PL (Figura 36).

Figura 36. A y B, células de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con el plásmido CRISPRPL. C. Control negativo, cepas wild type de LBA4404 en medio suplementado con Kanamicina 50 µg/ml



Posteriormente, se tomaron las colonias que crecieron en el medio de selección suplementado con Kanamicina 50 µg/ml y se realizó una PCR de colonia para amplificar el gen de resistencia a Higromicina, también se le realizó esta PCR a una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* de la cepa LBA4404 que no contenía el vector de Crispr (Figura 37)

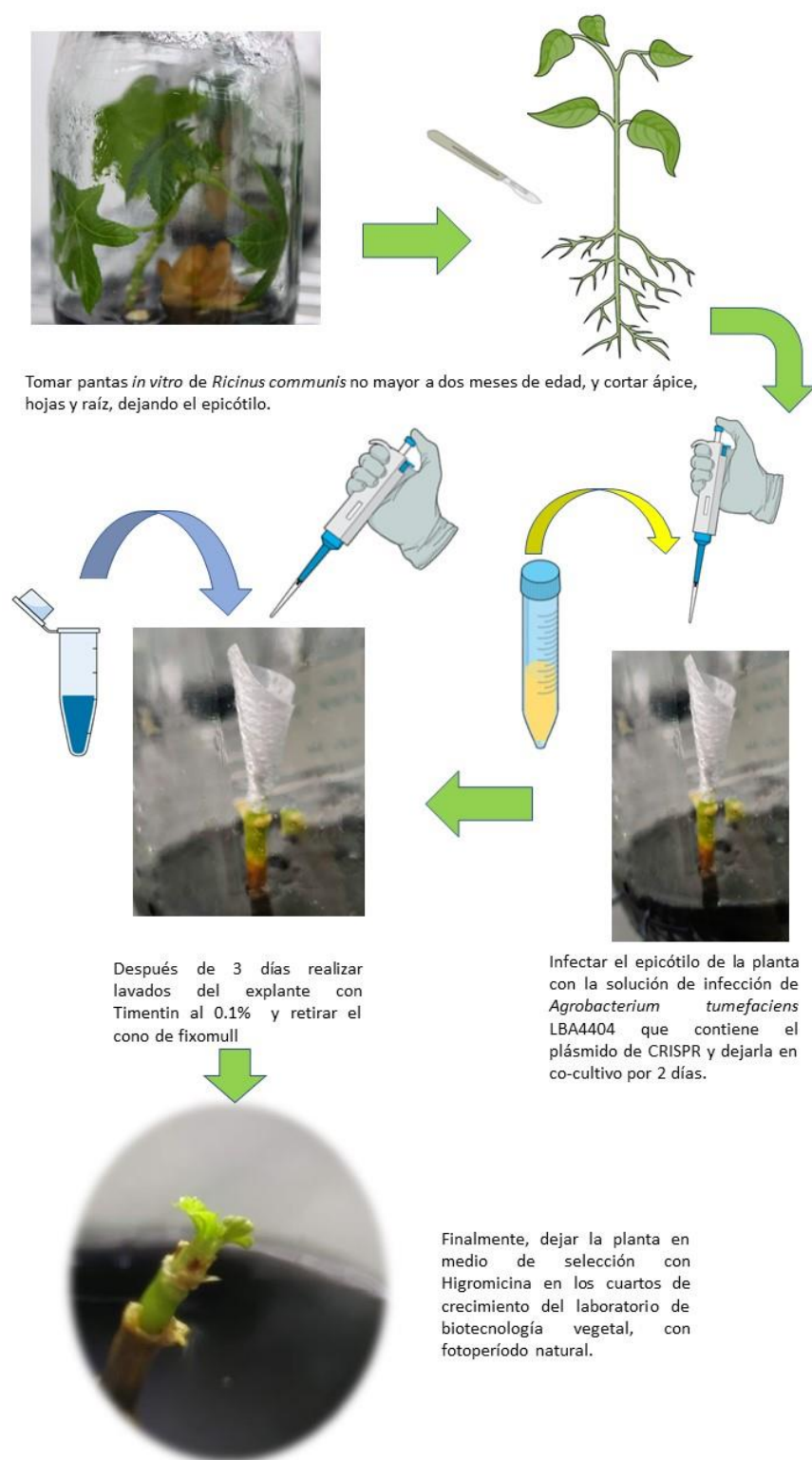
Figura 37. Electroforesis al 1.2% en gel de agarosa en el que se evidencian los fragmentos amplificados del gen de resistencia de Higromicina que contiene el plásmido CRISPRPL. Carril 1, amplificación gen en cepa LBA4404 no transformadas. Carriles 2, 3, 4 y 5 amplificación en LBA4404 transformadas con el plásmido CRISPRPL



3.5.1.2 Transformación plantas

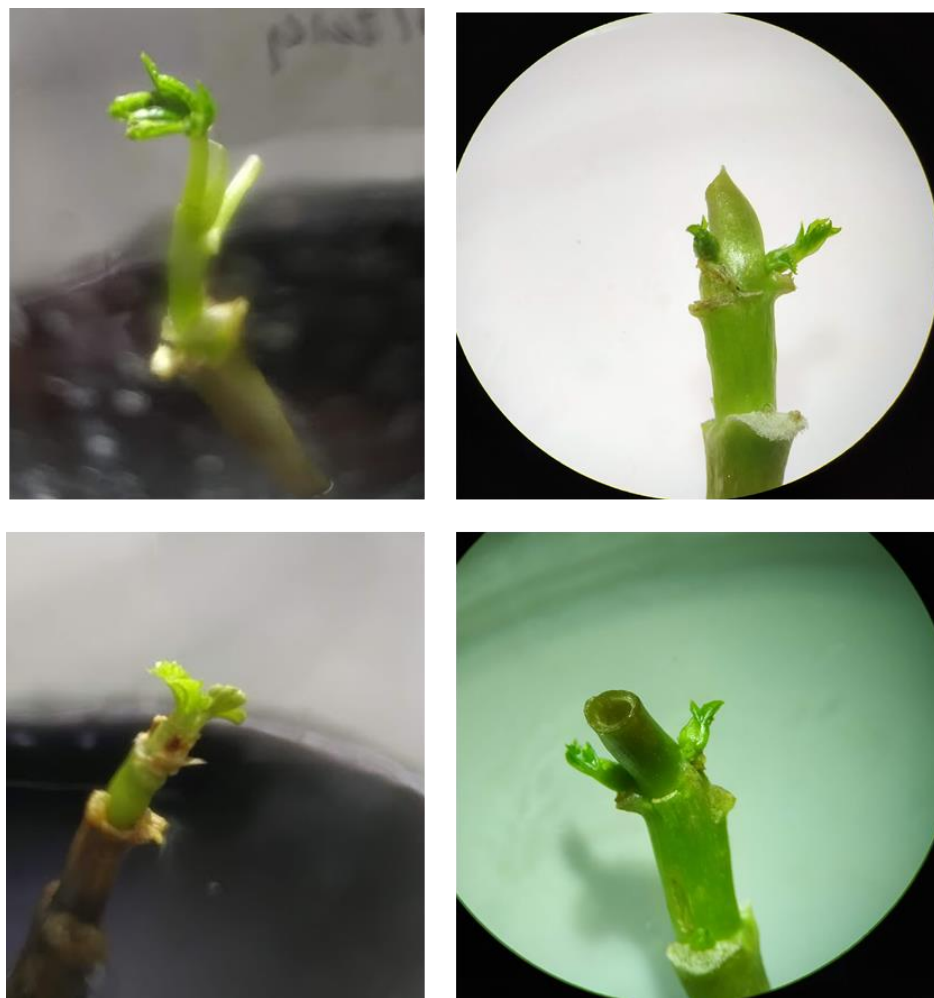
Después de tener el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 transformado con el vector de expresión de CRISPR/Cas9, se procedió a tomar la planta *in vitro* de *R. communis* y se cortó ápice, raíz y hojas, dejando la sección de epicótilo, los cuales se sometieron al proceso de infección con la *Agrobacterium* durante un co-cultivo de 3 días, después se realizaron los lavados correspondientes a los explantes con el antibiótico Timentin al 0.1% y se dejaron en el medio de regeneración y selección con 20 mg/L de Higromicina para seleccionar aquellos explantes que integraron el plásmido (Ver figura 38)

Figura 38. Esquema de transformación mediante *A. tumefaciens* que contiene el vector CRISPR en epicótilos de *R. communis*



En la figura 39 se muestra el desarrollo gradual de brotes regenerados a partir de epicótilos usados para la transformación con *Agrobacterium*. Estos brotes se obtuvieron después de 2 meses de cultivos, con sub-cultivos cada 15 días en medio de selección suplementado con Higromicina 20 mg/L y en las condiciones de crecimiento del laboratorio de biotecnología vegetal bajo fotoperiodo natural.

Figura 39. Epicótilos de *R. communis* regenerados en medio de selección después de proceso de infección con *Agrobacterium* con plásmido CRISPRPL



3.5.1.3. Análisis mediante qPCR de las plantas de *R. communis* sometidas a la transformación mediada *Agrobacterium*.

En total, se hizo la transformación de 117 plantas, pero solo 38 plantas lograron regenerar sin contaminación alguna por *Agrobacterium*. En la tabla 25 se resumen las plantas con el sgRNA

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9
 guía utilizado en el plásmido CRISPRPL, en la misma se muestra las cuantificaciones relativas que generó el software del equipo (CFX Maestro).

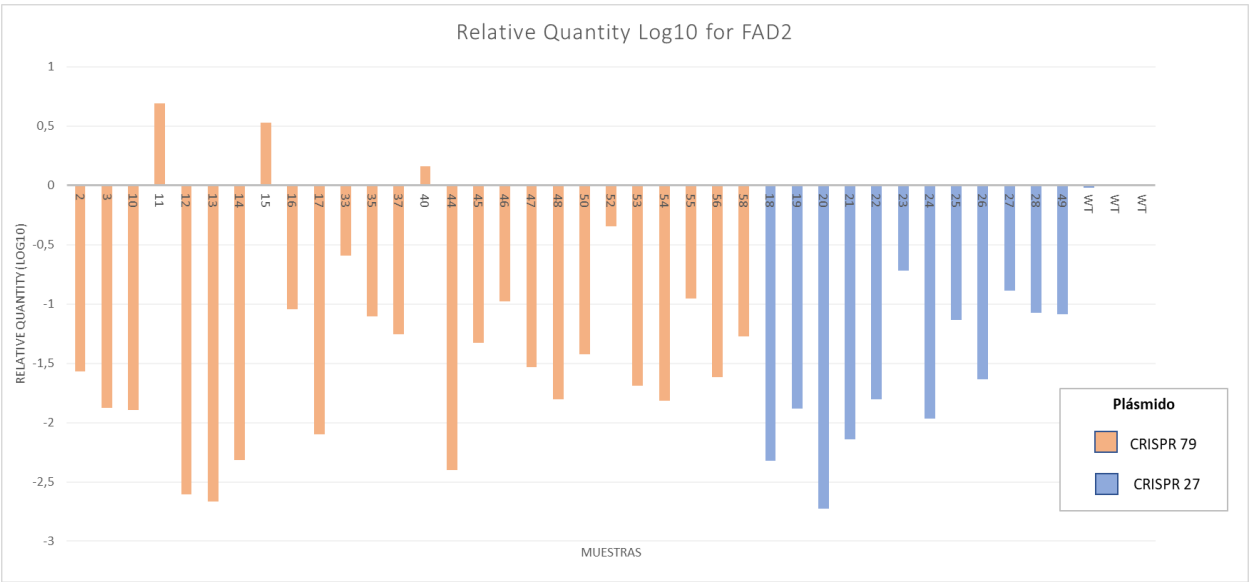
Tabla 25. Plantas que fueron sometidas al proceso de transformación que lograron llegar a fase de regeneración. Se muestra la cuantificación relativa normalizada a plantas Wild tType de *R. communis* para el gen FAD2 con cada uno de los sgRNA

Número muestra (planta)	sgRNA	Fecha transformación	Relative Quantity	Relative Quantity (Log10)
2	CRISPR 79	13/12/2018	0,02695	-1,56944123
3	CRISPR 79	13/12/2018	0,01322	-1,878768545
10	CRISPR 79	17/7/2019	0,01279	-1,893129456
11	CRISPR 79	17/7/2019	4,89	0,68895524
12	CRISPR 79	13/5/2019	0,00247	-2,607303047
13	CRISPR 79	13/5/2019	0,00215	-2,66756154
14	CRISPR 79	17/7/2019	0,00482	-2,316952962
15	CRISPR 79	17/7/2019	3,37	0,527308894
16	CRISPR 79	17/7/2019	0,08968	-1,0473044
17	CRISPR 79	17/7/2019	0,00791	-2,101823517
18	CRISPR 27	13/5/2019	0,00473	-2,325138859
19	CRISPR 27	17/7/2019	0,01304	-1,884722409
20	CRISPR 27	17/7/2019	0,00188	-2,725842151
21	CRISPR 27	17/7/2019	0,00725	-2,139661993
22	CRISPR 27	13/5/2019	0,01561	-1,806597097
23	CRISPR 27	17/7/2019	0,19168	-0,717423199
24	CRISPR 27	17/7/2019	0,01079	-1,966978555
25	CRISPR 27	13/5/2019	0,07375	-1,132237975
26	CRISPR 27	17/7/2019	0,02312	-1,63601217
27	CRISPR 27	17/7/2019	0,12947	-0,887830852
28	CRISPR 27	13/5/2019	0,08465	-1,072373038
33	CRISPR 79	17/6/2019	0,25392	-0,595303091
35	CRISPR 79	17/7/2019	0,07799	-1,10796108
37	CRISPR 79	8/4/2019	0,05559	-1,255003326
40	CRISPR 79	13/05/2019	1,46	0,162919702
44	CRISPR 79	17/6/2019	0,00396	-2,402304814
45	CRISPR 79	20/9/2019	0,04675	-1,330218385
46	CRISPR 79	20/9/2019	0,10511	-0,978355964
47	CRISPR 79	20/03/2019	0,02924	-1,534022632
48	CRISPR 79	20/9/2019	0,01562	-1,80631897
49	CRISPR 27	20/3/2019	0,08173	-1,087618501
50	CRISPR 79	20/9/2019	0,03756	-1,425274416
52	CRISPR 79	20/9/2019	0,45393	-0,343011114
53	CRISPR 79	20/9/2019	0,0204	-1,690369833

54	CRISPR 79	20/9/2019	0,01536	-1,813608784
55	CRISPR 79	20/9/2019	0,11182	-0,951480512
56	CRISPR 79	20/9/2019	0,02402	-1,619426997
58	CRISPR 79	20/9/2019	0,05304	-1,275396485
Hoja	WT	---	0,95027	-0,022152981
Tallo	WT	---	1	0
Tallo	WT	---	1	0

Al graficar los resultados de la cuantificación relativa en Log 10, se visualizó la sobre y sub-expresión del gen FAD2 en los epicótilos de *R. communis* (Figura 40)

Figura 40. Gráfica de cuantificación relativa para las plantas de *R. communis* de la tabla 25 para el gen FAD2.



Las barras de color naranja de la figura 40 corresponden a plantas que fueron transformadas mediante *Agrobacterium* que contenía en el vector CRISPRPL el sgRNA CRISPR 79, de igual manera, las barras azules son las que en el vector tenían el sgRNA CRISPR 27. Cuando están por debajo de cero están indicando un proceso de sub expresión del gen FAD2 y cuando están por encima de 0 indican una sobre expresión del gen FAD2. En este caso, solo 3 muestras presentaron una sobre expresión del gen FAD2 (muestras 11, 15 y 40).

Por otro lado, la figura 41, muestra las curvas de amplificación del gen FAD2 en las muestras de epicótilos transformados con CRISPR en unidades de fluorescencia relativa para Sybr green, las líneas rojas corresponden a plantas wild type y se observa que su amplificación comienza un poco más allá del ciclo 22, a excepción del primer recuadro que está cercano al ciclo 24. Las muestras de cDNA de las plantas tiene ciclos más tardíos, cercanos al 26.

Figura 41. Curva de amplificación de qRT-PCR para el gen FAD2 de las muestras de cDNA de las plantas sometidas al proceso de transformación mediada con *Agrobacterium* con el plásmido CRISPR. En verde, plantas sometidas al proceso de transformación, en rojo plantas wild type.

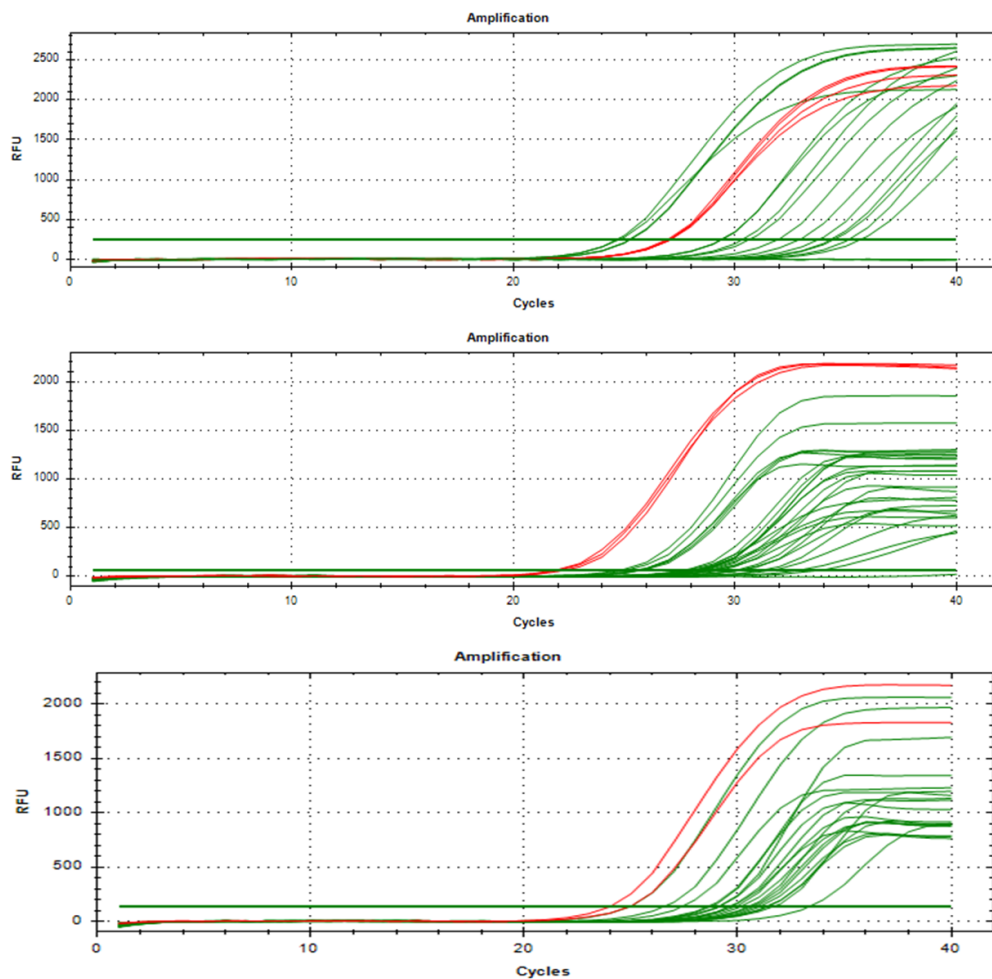
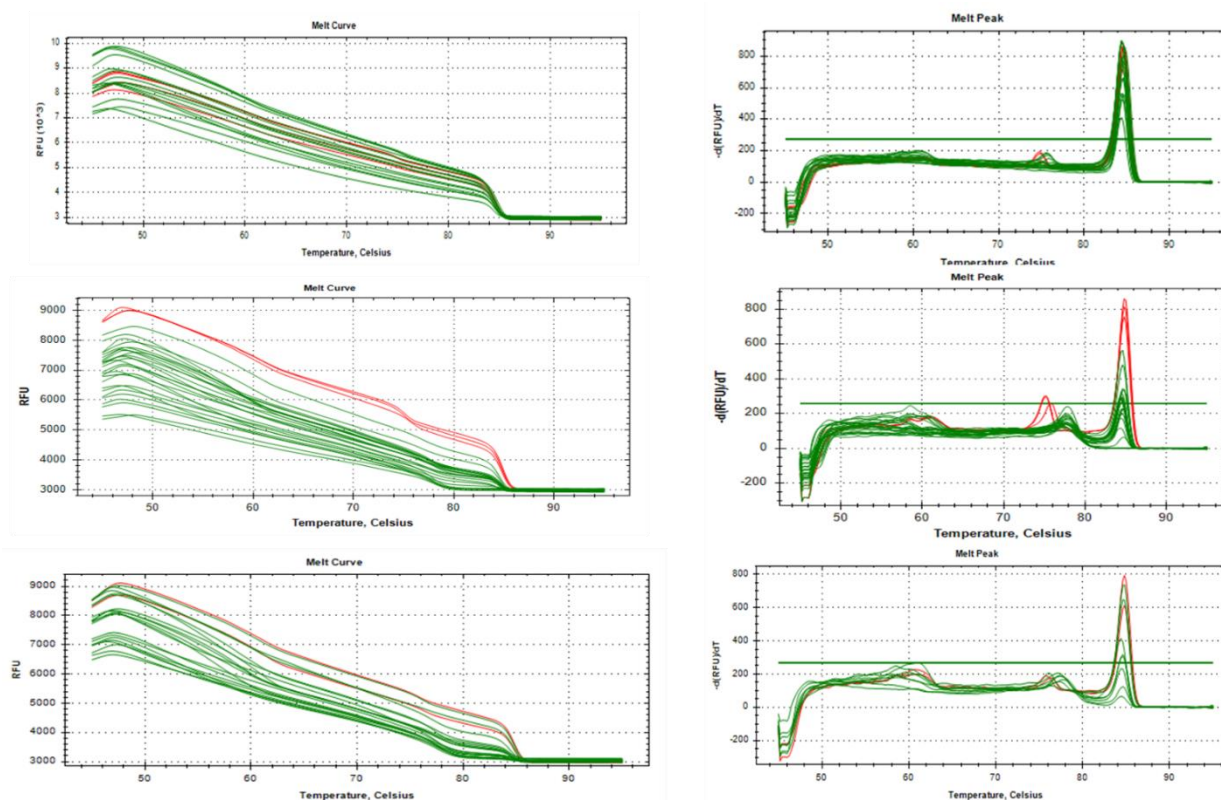


Figura 42. Curvas de melting de qRT-PCR para el gen FAD2 de las muestras de cDNA de las plantas sometidas al proceso de transformación mediada con *Agrobacterium* con el plásmido CRISPR. En verde, plantas sometidas al proceso de transformación, en rojo plantas wild type.



En las curvas de melting de la figura 42, verificamos que para todas las muestras se estuviera amplificando el fragmento específico del FAD2 y no inespecificidades, la curva que se ve antes del pico de melting del fragmento corresponden a dímeros de primers.

Tanto los cambios de temperatura como la forma de la curva se utilizan para identificar diferencias en las secuencias del gen amplificado. Las variantes alélicas que corresponden a secuencias homocigotas se caracterizan típicamente por el cambio de temperatura observada en una curva de fusión HRM, mientras que los heterocigotos se caracterizan comúnmente por un cambio en la forma de la curva de fusión generada a partir de emparejamientos erróneos de emparejamiento de bases, estos cambios se contrastan con plantas de tipo wild type (Taylor et al. 2009). Los datos de expresión del gen FAD2 de las plantas sometidas al proceso de edición, se analizaron con el software HRM de Bio-Rad, y se tomó como clúster de referencia las plantas wild type que no se sometieron al proceso de transformación con *Agrobacterium* (Figura 43) Se evidencian diferentes

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9
clústers según las temperaturas de melting, que difieren del clúster de referencia que son plantas wild type (Tabla 26).

Figura 43. High resolution melting analysis para las muestras de cDNA de las plantas de interés. A. Cluster rojo son las plantas wild type, cluster azul, verde y naranja son plantas sometidas al proceso de transformación. B y C, Cluster azul son plantas wild type y cluster rojo, verde y naranja plantas sometidas al proceso de transformación. La fluorescencia se expresa en unidades de fluorescencia relativa (RFU).

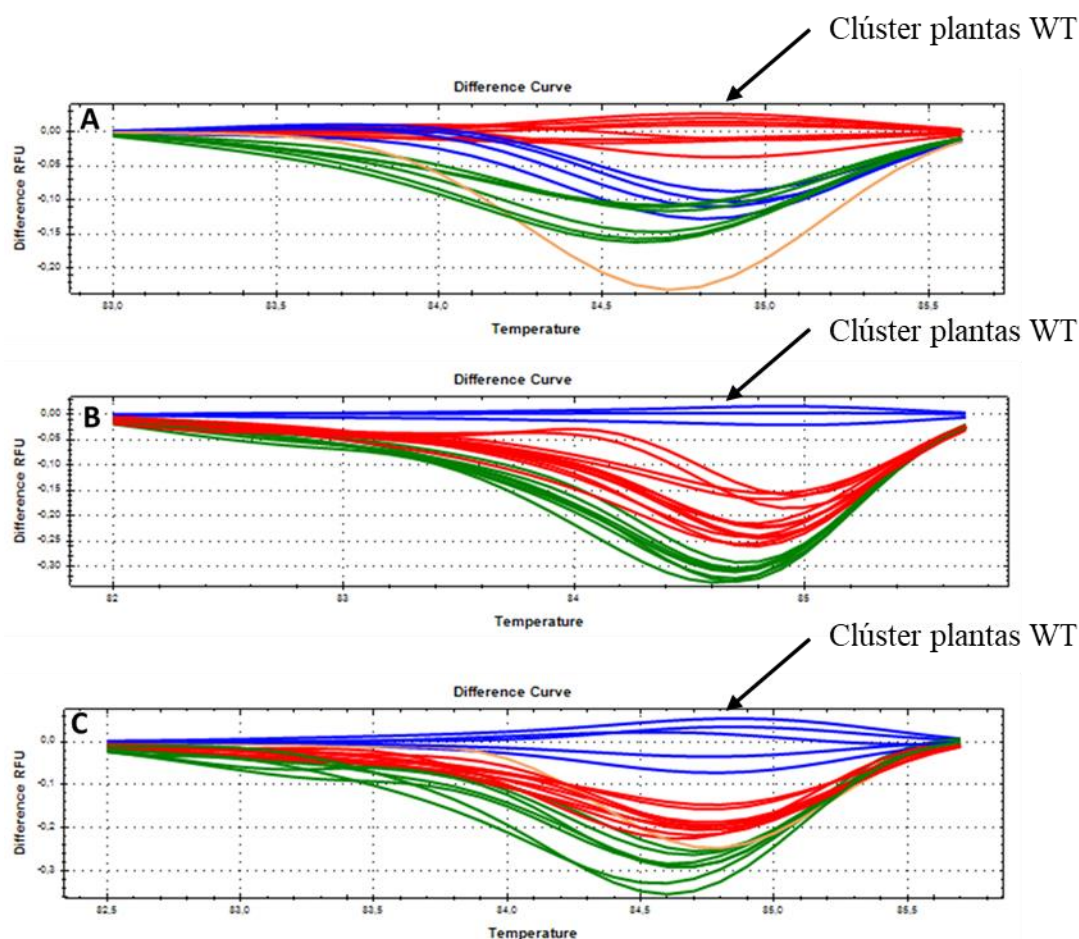


Tabla 26. Muestras que corresponden a cada uno de los clústeres del análisis HRM que se visualizan en la figura 40.

Figura	Cluster	Muestras
A	Cluster 1	23, 26, T, H
	Cluster 2	11, 15, 16
	Cluster 3	18, 21
	Cluster 4	12
B	Cluster 1	3, 10, 17, 25, 27, 28
	Cluster 2	10, 13, 14, 19, 22
	Cluster 3	T, H
C	Cluster 1	33, 35, 37, 46, 47, 48, 50, 55
	Cluster 2	2, 45, 49, 53, 54, 56, 58
	Cluster 3	40, 52, T, H

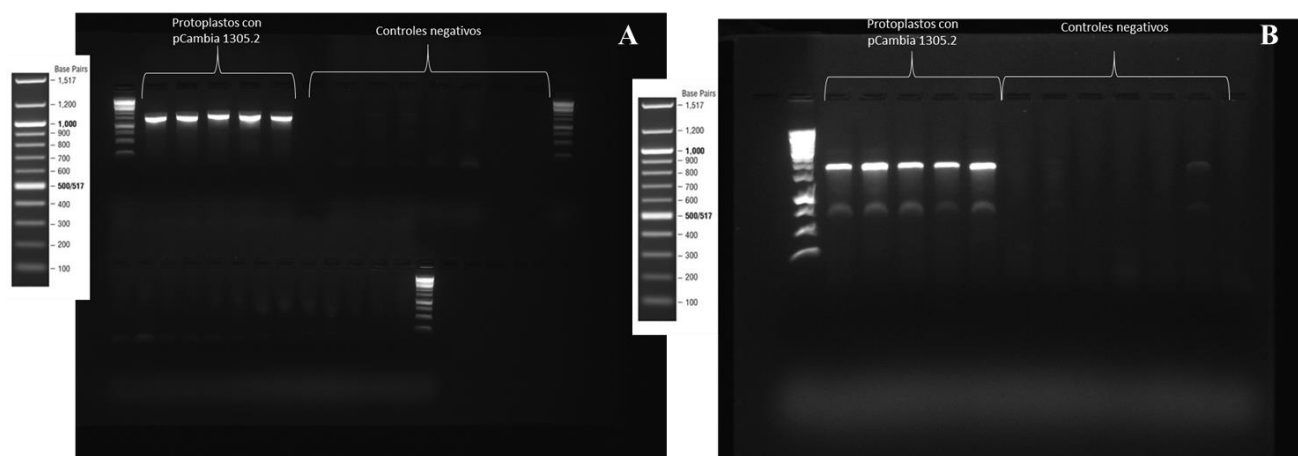
3.5.2. Transfección de protoplastos de *Ricinus communis* mediante la ribonucleoproteína CRISPR/Cas9

3.5.2.1. Amplificación del gen de resistencia del plásmido control ingresado a protoplastos de *Ricinus communis*.

Después de ejecutar el ensayo que nos permitió verificar el ingreso del plásmido control (pCambia 1305.2) mediante PEG-4000 a protoplastos de *Ricinus communis* se logró evidenciar que después de la amplificación del gen de resistencia a higromicina que tiene el plásmido, existe un producto de PCR claro con respecto a controles negativos, que consistían en DNA de protoplastos que no fueron sometidos a transfección con PEG-4000 (figura 44)

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9

Figura 44. A y B. Electroforesis al 1.2% de agarosa muestra los resultados de las amplificaciones del gen *hptII* del plásmido pCambia 1305.2 que se ingresó a protoplastos de *R. communis* mediante transfección mediada por PEG-4000 como prueba piloto.



3.5.2.2. Transfección de protoplastos de *Ricinus communis* mediante la ribonucleoproteína CRISPR/Cas9.

En total se realizaron 20 experimentos de transfección de la RNP en protoplastos de *R. communis*, de estos 20 experimentos, 10 se hicieron con el sgRNA 27 y los 10 experimentos restantes con el sgRNA 79. Luego se procedió con la extracción de DNA de estos protoplastos para amplificar la región FAD2 con el primer 106.

3.5.2.2.1. Secuenciación de los productos de PCR del gen FAD2 de las muestras de *R. communis* transformados con *Agrobacterium* y protoplastos de *R. communis* transfectados con RNP.

Las muestras de los productos de PCR que amplificaron la región del gen FAD2 en las regiones de edición con los sgRNA del sistema CRISPR en epicótilos y protoplastos de *R. communis* se secuenciaron mediante la secuenciación tipo Sanger en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia. Se enviaron un total de 58 muestras (cada una por duplicado), 38 correspondían a las muestras de epicótilos transformados y 20 a los protoplastos transfectados.

En cada uno de los ensayos, se vio que la secuencia que correspondía al sitio de edición 27 estaba con baja calidad y no permitió sacar una secuencia clara de lo que probablemente haya ocurrido en dicho sitio, además, la secuencia que reporta como consenso es muy similar a la Wild type lo que probablemente indica que no ocurrió una edición en dicho lugar, el mismo patrón se observó para el sitio de edición 79. Finalmente, se nota que la secuenciación para los productos de PCR fueron de menor calidad antes y después de la región 27 y 79, que son las de nuestro interés porque

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9 allí se realizaba la edición por parte de Crispr/Cas9, esto se puede explicar con relación al tamaño que amplifica los primers que es de 150 bp, lo que lo hace ser muy pequeño el fragmento, y esto puede hacer los extremos sensibles a tener bajas calidades justo en nuestras zonas de edición por parte de los sgRNA. No obstante, estos resultados se encuentran actualmente en repetición para verificar su fiabilidad.

3.5.Discusión

La cuantificación relativa describe el cambio en la expresión de un gen de interés con respecto a un grupo de referencia, que para este caso son plantas de higuera no tratadas (Livak and Schmittgen 2001). Es una herramienta útil para investigar pequeños cambios a nivel fisiológico en niveles de expresión génica (Wojciechowska-Durczyńska et al. 2010). Para alcanzar una expresión relativa optima, se usan estrategias de normalización apropiadas para controlar los errores experimentales (Vandesompele et al. 2002; Pfaffl et al. 2004). En esta investigación, se utilizó el software CFX Maestro de la casa Bio-Rad para el análisis de expresión de las diferentes muestras, en donde se generó una cuantificación relativa al control, que para este caso son plantas de higuera que no fueron sometidas al proceso de transformación (plantas wild type de higuera de la variedad VERC02). Según Heppard et al. 1996 reportaron que el gen FAD2 se expresa fuertemente en el desarrollo de semillas de soya, y en tejidos vegetativos. En contraste, en semillas de higuera, FAD2 se encuentra expresado en menores cantidades comparado con los niveles de expresión FAH12 (Lu, Wallis, and Browse 2007), expresión del gen FAD2 que pretende solo mantener la síntesis de los lípidos de membrana y funciones celulares que el endospermo demanda en este estadio.

En este estudio, se encontraron unas plantas que presentaron baja expresión (downregulation) para el gen FAD2 ($p < 0.0001$), a excepción de las muestras 11, 15 y 40 que muestran una sobreexpresión (upregulation) para este mismo gen. En la figura 37, se puede apreciar que para ambos constructos con los sgRNA's diseñados, ocurrió una baja expresión del gen de interés, pero llama la atención que el que contiene sgRNA 79 sea el único que muestra plantas que pareciese que no fueron afectadas durante el proceso de transformación. La muestra que presenta un valor menor en la cuantificación relativa con respecto al control es la 20 (0,00188), seguida por la 13 (0,00215) y 12 (0,00247).

Respecto a las curvas de melting, el "DNA Melting" ocurre cuando la doble cadena de DNA se separa en una sola hebra de DNA. El melting del DNA puede ser monitoreado con fluorescencia en la cadena doble, cuando el producto de PCR es desarmado en la presencia de un fluoróforo (para este caso es SYBR green) que está en la doble cadena, y, por lo tanto, la fluorescencia es monitoreada continuamente y graficada en contra de la temperatura. A medida que la temperatura aumenta, existe una caída característica en la fluorescencia a una temperatura alta que coincide

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9 con la desnaturalización del producto de PCR (Reed, Kent, and Wittwer 2007; Corbett Research, n.d.) .

High-resolution melting del DNA para genotipificación ha sido posible por tres desarrollos en los 2000`s. Inicialmente se identificaron fluorocromos para DNA de doble cadena, luego se desarrollaron instrumentos para high-resolution melting como es el caso de la PCR real time; finalmente, se desarrolló softwares para la normalización de datos, comparación de formas en las curvas y clustering de genotipos. Con estos tres avances se incrementó la calidad en las curvas de melting y permitió la detección de pequeñas diferencias en las secuencias de productos de PCR.

La mejor presentación de los datos de curvas de melting, es mediante graficas diferenciales, debido a que diferentes genotipos son fáciles de identificar en este tipo de gráficos. Estos se crean graficando la diferencia entre una curva de referencia y todas las otras curvas de melting. La curva de referencia usualmente es un promedio de las curvas de melting de un organismo wild type y este grupo se ubica alrededor del eje horizontal. Diferentes genotipos se agrupan para hacer fácil una discriminación visual. HRM nos permite la identificación rápida y eficiente de mutaciones en productos de PCR (Schmidt et al. 1994); un producto homoduplex generado a partir de una muestra de ADN homocigoto tendrá un T_m particular, un producto heterodúplex generado a partir de un individuo heterocigoto tendrá una T_m diferente, por lo general es más baja, lo que permite identificar alelos mutantes. El protocolo para HRM no requiere manipulaciones adicionales, como digestiones o geles de agarosa, después de la PCR, solo una exploración de HRM de 5 minutos que hace un análisis in silico. (Reed, Kent, and Wittwer 2007)

Análisis de High resolution melting permite generar curvas de melting del DNA que son lo suficientemente específicas y sensibles para distinguir variaciones en la secuencia de una manera exploratoria (Er and Chang 2012). Usar esta metodología provee beneficios que han resultado en muchas aplicaciones en análisis genéticos, incluyendo aplicaciones microbiológicas y en investigación de genética de plantas (Simko 2016)

En la figura 41, se evidencia que claramente, que las plantas que fueron sometidas al proceso de transformación presentan curvas de melting diferentes a las plantas wild type, puesto que se observan diferentes clusters asociados a estas curvas de melting (ver tabla 26). En esta misma figura, las plantas wild type se muestra como una línea horizontal de un color en particular y las curvas de diferencia en la fluorescencia se agrupan inmediatamente en clusters, las curvas HRM son significativamente diferentes al WT. En los gráficos de la figura 40, los clusters que difieren al cluster de las plantas WT, probablemente son líneas mutantes homocigóticas puesto que la curva es totalmente diferente a la de las WT y no se cruza con ésta. (Li et al. 2018) (Lochlainn et al. 2011).

Llama la atención los tiempos de regeneración de los epicótilos de *R. communis* después de la transformación, puesto que fueron más lentos de los reportado por (Gil-Correal et al. 2019), y para explicar esto, es necesario citar el siguiente estudio: en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se han realizado mutaciones en la enzima FAD2. Según el estudio realizado por Caiveau et al. (2001)

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9

las plantas “wild type” presentaron un incremento en el 70% del ácido oleico, el ácido linoleico por su parte, se registró en menos de 2% en las plantas que presentaban la mutación en la FAD2, así mismo, se aumentó aproximadamente el 40% de la proporción lípidos/proteínas y la microviscosidad de la membrana aumentó para las plantas que presentaban el carácter mutado, siendo consistentes con la premisa que al disminuir las insaturaciones en las cadenas acyl de fosfolípidos aumenta la microviscosidad. La mutación de la enzima FAD2 también afectó la bioenergética mitocondrial, reduciendo las tasas respiratorias, la energía de activación en los estados 3 y 4 de la respiración fue mayor para las plantas con éstas con la mutación presente. Se necesitan realizar más estudios en Higuierilla sobre el papel de la enzima FAD2 durante el crecimiento de la planta en tejidos vegetativos y así relacionarlos con el retraso en el crecimiento de los explantes transformados (posiblemente mutados). Ahora bien, respecto a la transfección de protoplastos, se verificó que el protocolo de transfección con las concentraciones y condiciones adecuadas de PEG-4000 funciona, puesto que se logró amplificar la secuencia que codifica para el gen de resistencia.

3.6. Conclusiones

Las metodologías y protocolos evaluados para la transfección directa de la ribonucleoproteína vía protoplastos de *R. communis* y vía transformación de células de epicótilo de *R. communis* mediante *Agrobacterium tumefaciens*, como opciones de introducción del sistema CRISPR para la edición del gen FAD2, resultaron eficientes para los objetivos propuestos de acercarnos a eventos de edición genética para la mutación del gen FAD2 que presuntamente va a generar mayores contenidos de ácido ricinoleico a nivel de semilla de las plantas mutadas.

Las plantas en las que se analizó los niveles de expresión de la enzima FAD2 presentaron variaciones en la T_m con respecto a plantas de higuierilla que no fueron sometidas a procesos de transformación, diferencias que se ven de manera clara cuando se generan las gráficas de HRM, que separa las plantas sometidas a la transformación mediada por *Agrobacterium* con las plantas wild type y nos permite dar un primer indicio de mutaciones que pudieron ocurrir en las plantas sometidas a transformación por *Agrobacterium*.

Finalmente, el objetivo de este capítulo se logró puesto que se establecieron dos metodologías con el sistema de edición CRISPR/Cas9 para la especie *R. communis*. Con la primera metodología que involucraba un vector de expresión que se transfería mediante *Agrobacterium* se logró que los epicótilos se regeneraran y al momento de evaluar molecularmente la expresión del gen FAD2, se evidenció sub expresión del mismo, indicando una posible mutación. La segunda metodología que consistía en el uso de la RNP transfectados a protoplastos mediante PEG-4000 se logró estandarizar y con ello, que ingresara el complejo del sgRNA a los protoplastos y para cultivarlos según se describe en el primer capítulo.

3.8. Referencias

- A. Sarvesh, D.M. Ram Rao, T.P. Reddy. 1992. “Callus Initiation and Plantlet Regeneration from Epicotyl and Cotyledonary Explants of Castor (*Ricinus Communis* L.).” *Adv. Plant Sci.* 5: 124–28.
- Agari, Yoshihiro, Seiki Kuramitsu, and Akeo Shinkai. 2010. “Identification of Novel Genes Regulated by the Oxidative Stress-Responsive Transcriptional Activator SdrP in *Thermus Thermophilus* HB8.” *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02133.x>.
- Ahn, Yeh-Jin, Louisa Vang, Thomas A McKeon, and Grace Q Chen. 2007. “High-Frequency Plant Regeneration through Adventitious Shoot Formation in Castor (*Ricinus Communis* L.).” *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant* 43 (1): 9–15. <http://www.jstor.org/stable/20461638>.
- Aishwariya, V, Ravindra Ramrao, E Kokila, L Arul, D Sudhakar, and K K Kumar. 2015. “IMPACT OF TDZ (THIDIAZURON) PULSE TREATMENT IN SINGLE AND MULTIPLE SHOOT FORMATION IN CALLI OF *JATROPHA CURCAS* L . [II] MATERIALS AND METHODS [III] RESULTS” 3 (3): 879–84.
- Alonso, José M., Anna N. Stepanova, Thomas J. Leisse, Christopher J. Kim, Huaming Chen, Paul Shinn, Denise K. Stevenson, et al. 2003. “Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis Thaliana*.” *Science* 301 (5633): 653–57. <https://doi.org/10.1126/science.1086391>.
- Amin, Noor A L, Naveed Ahmad, W U Nan, F U Xiuming, Wang Nan, B O Xiaoxue, M A Tong, and Wang Piwu. 2018. “AN EFFICIENT TRANSIENT ASSAY FOR CRISPR CAS9 SYSTEM DELIVERING TARGETED MUTATION USING SYNTHETIC OLIGO SgRNA IN SOYBEAN (GLYCINE AN EFFICIENT TRANSIENT ASSAY FOR CRISPR CAS9 SYSTEM DELIVERING TARGETED MUTATION USING SYNTHETIC OLIGO SgRNA IN SOYBEAN (GLY,” no. July.
- Amoo, Stephen O., Jeffrey F. Finnie, and Johannes van Staden. 2011. “The Role of Meta-Topolins in Alleviating Micropropagation Problems.” *Plant Growth Regulation* 63 (2): 197–206. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9504-7>.
- Anand, Ajith, Steven H Bass, Emily Wu, Ning Wang, Kevin E McBride, Narayana Annaluru, Michael Miller, Mo Hua, and Todd J Jones. 2018. “An Improved Ternary Vector System for *Agrobacterium*-Mediated Rapid Maize Transformation.” *Plant Molecular Biology* 97 (1–2): 187–200. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0732-y>.

- Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9
- Anand, Ajith, Srinivasa Rao Uppalapati, Choong Min Ryu, Stacy N. Allen, Li Kang, Yuhong Tang, and Kirankumar S. Mysore. 2008. "Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance Play a Role in Attenuating Crown Gall Disease Caused by *Agrobacterium Tumefaciens*." *Plant Physiology* 146 (2): 703–15. <https://doi.org/10.1104/pp.107.111302>.
- Andersson, Anders F., and Jillian F. Banfield. 2008. "Virus Population Dynamics and Acquired Virus Resistance in Natural Microbial Communities." *Science* 320 (5879): 1047–50. <https://doi.org/10.1126/science.1157358>.
- Aremu, Adeyemi O., Michael W. Bairu, Karel Doležal, Jeffrey F. Finnie, and Johannes Van Staden. 2012. "Topolins: A Panacea to Plant Tissue Culture Challenges?" *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0007-7>.
- Bafor, M, M a Smith, L Jonsson, K Stobart, and S Stymne. 1991. "Ricinoleic Acid Biosynthesis and Triacylglycerol Assembly in Microsomal Preparations from Developing Castor-Bean (*Ricinus Communis*) Endosperm." *The Biochemical Journal* 280 (Pt 2: 507–14.
- Baghel, Sapna, and Yogendra Kumar Bansal. 2015. "In Vitro Regeneration of Oil Yielding Plants-A Review." *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 18 (5): 1022–50. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.971068>.
- Barrangou, Rodolphe, Christophe Fremaux, Hélène Deveau, Melissa Richards, Patrick Boyaval, Sylvain Moineau, Dennis A. Romero, and Philippe Horvath. 2007. "CRISPR Provides Acquired Resistance against Viruses in Prokaryotes." *Science* 315 (5819): 1709–12. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>.
- Berman, Paula, Shahar Nizri, and Zeev Wiesman. 2011a. "Castor Oil Biodiesel and Its Blends as Alternative Fuel." *Biomass and Bioenergy* 35 (7): 2861–66. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.03.024>.
- . 2011b. "Castor Oil Biodiesel and Its Blends as Alternative Fuel." *Biomass and Bioenergy* 35 (7): 2861–66. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.03.024>.
- Bhojwani, S. S. (Sant Saran), and M. K. Razdan. 1996. *Plant Tissue Culture : Theory and Practice*. Elsevier.
- Birch, R G. 1997. "PLANT TRANSFORMATION: Problems and Strategies for Practical Application." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48 (June): 297–326. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.297>.
- Borgato, L., F. Pisani, and A. Furini. 2007. "Plant Regeneration from Leaf Protoplasts of *Solanum Virginianum* L. (Solanaceae)." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88 (3): 247–52. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9196-x>.
- Boyes, C.J., F.J. Zapata, and K.C. Sink. 1980. "Isolation, Culture and Regeneration to Plants of Callus Protoplasts of *Salpiglossis Sinuata* L." *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie* 99 (5):

471–74. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(80\)80162-0](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(80)80162-0).

- Broun, P, S Boddupalli, and C Somerville. 1998. “A Bifunctional Oleate 12-Hydroxylase: Desaturase from *Lesquerella Fendleri*.” *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 13 (2): 201–10. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00023.x>.
- Brown, Adrian P., Johan T M Kroon, David Swarbreck, Melanie Febrer, Tony R. Larson, Ian A. Graham, Mario Caccamo, and Antoni R. Slabas. 2012. “Tissue-Specific Whole Transcriptome Sequencing in Castor, Directed at Understanding Triacylglycerol Lipid Biosynthetic Pathways.” *PLoS ONE* 7 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030100>.
- Caiveau, Olivier, Dominique Fortune, Catherine Cantrel, Alain Zachowski, and François Moreau. 2001. “Consequences of ω -6-Oleate Desaturase Deficiency on Lipid Dynamics and Functional Properties of Mitochondrial Membranes of *Arabidopsis Thaliana*.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (8): 5788–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006231200>.
- Carte, Jason, Ruiying Wang, Hong Li, Rebecca M. Terns, and Michael P. Terns. 2008. “Cas6 Is an Endoribonuclease That Generates Guide RNAs for Invader Defense in Prokaryotes.” *Genes and Development* 22 (24): 3489–96. <https://doi.org/10.1101/gad.1742908>.
- Caspi, Ron, Tomer Altman, Richard Billington, Kate Dreher, Hartmut Foerster, Carol A. Fulcher, Timothy A. Holland, et al. 2014. “The MetaCyc Database of Metabolic Pathways and Enzymes and the BioCyc Collection of Pathway/Genome Databases.” *Nucleic Acids Research* 42 (D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1103>.
- Chan, Agnes P., Jonathan Crabtree, Qi Zhao, Hernan Lorenzi, Joshua Orvis, Daniela Puiu, Admasu Melake-Berhan, Kristine M. Jones, Julia Redman, Grace Chen, Edgar B. Cahoon, Melaku Gedil, Mario Stanke, Brian J. Haas, Jennifer R. Wortman, Claire M. Fraser-Liggett, Jacques Ravel, and Pablo D. Rabinowicz. 2010. “Draft Genome Sequence of the Oilseed Species *Ricinus Communis*.” *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.1674>.
- Chan, Agnes P, Jonathan Crabtree, Qi Zhao, Hernan Lorenzi, Joshua Orvis, Daniela Puiu, Admasu Melake-Berhan, Kristine M Jones, Julia Redman, Grace Chen, Edgar B Cahoon, Melaku Gedil, Mario Stanke, Brian J Haas, Jennifer R Wortman, Claire M Fraser-Liggett, Jacques Ravel, Pablo D Rabinowicz, et al. 2010. “Draft Genome Sequence of the Ricin-Producing Oilseed Castor Bean.” *Nat Biotechnol*. <https://doi.org/10.1038/nbt.1674>.
- Chauhan, Raj Deepika, and Nigel James Taylor. 2018. “Meta-Topolin Stimulates de Novo Shoot Organogenesis and Plant Regeneration in Cassava.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 132 (1): 219–24. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1315-3>.
- Chen, Jiang, Qiang Yi, Qiaoheng Song, Yong Gu, Junjie Zhang, Yufeng Hu, Hanmei Liu, Yinghong Liu, Guowu Yu, and Yubi Huang. 2015. “A Highly Efficient Maize Nucellus Protoplast System for Transient Gene Expression and Studying Programmed Cell Death-Related Processes.” *Plant Cell Reports* 34 (7): 1239–51. <https://doi.org/10.1007/s00299->

015-1783-z.

- Citovsky, Vitaly, Guido De Vos, and Patricia Zambryski. 1988. "Single-Stranded DNA Binding Protein Encoded by the VirE Locus of *Agrobacterium Tumefaciens*." *Science* 240 (4851): 501–4. <https://doi.org/10.1126/science.240.4851.501>.
- Cocking, E. C. 1960. "A Method for the Isolation of Plant Protoplasts and Vacuoles." *Nature* 187 (4741): 962–63. <https://doi.org/10.1038/187962a0>.
- Conde, Paula, and Conceição Santos. 2006. "An Efficient Protocol for *Ulmus Minor* Mill. Protoplast Isolation and Culture in Agarose Droplets." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86 (3): 359–66. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9122-2>.
- Corbett Research. n.d. "High Resolution Melt Assay Design and Analysis, Rotor-Gene 6000," 1–24.
- Cui, Jin, Kathryn Kuligowska Mackenzie, Tom Eeckhaut, Renate Müller, and Henrik Lütken. 2019. "Protoplast Isolation and Culture from *Kalanchoë* Species: Optimization of Plant Growth Regulator Concentration for Efficient Callus Production." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 138 (2): 287–97. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01624-4>.
- Davey, Michael R., Paul Anthony, J. Brian Power, and Kenneth C. Lowe. 2005. "Plant Protoplasts: Status and Biotechnological Perspectives." *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.09.008>.
- deFramond, Annick J., Kenneth A. Barton, and Mary Dell Chilton. 1983. "Mini-Ti: A New Vector Strategy for Plant Genetic Engineering." *Bio/Technology* 1 (3): 262–69. <https://doi.org/10.1038/nbt0583-262>.
- Deore, Ajay C., and T. Sudhakar Johnson. 2008. "High-Frequency Plant Regeneration from Leaf-Disc Cultures of *Jatropha Curcas* L.: An Important Biodiesel Plant." *Plant Biotechnology Reports* 2 (1): 7–11. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0042-y>.
- Deveau, Hélène, Josiane E. Garneau, and Sylvain Moineau. 2010. "CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions." *Annual Review of Microbiology* 64 (1): 475–93. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134123>.
- Díez-Villaseñor, C., C. Almendros, J. García-Martínez, and F. J.M. Mojica. 2010. "Diversity of CRISPR Loci in *Escherichia Coli*." *Microbiology* 156 (5): 1351–61. <https://doi.org/10.1099/mic.0.036046-0>.
- Doty, Sharon Lafferty, M. Christina Yu, J. Ingrid Lundin, Joe Don Heath, and Eugene W. Nester. 1996. "Mutational Analysis of the Input Domain of the VirA Protein of *Agrobacterium Tumefaciens*." *Journal of Bacteriology* 178 (4): 961–70. <https://doi.org/10.1128/jb.178.4.961-970.1996>.

- Durrenberger, F., A. Cramer, B. Hohn, and Z. Koukolikova-Nicola. 1989. "Covalently Bound VirD2 Protein of *Agrobacterium Tumefaciens* Protects the T-DNA from Exonucleolytic Degradation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (23): 9154–58. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9154>.
- Er, Tze Kiong, and Jan Gowth Chang. 2012. "High-Resolution Melting: Applications in Genetic Disorders." *Clinica Chimica Acta*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.09.012>.
- Erp, Harrie van, Philip D. Bates, Julie Burgal, Jay Shockey, and John Browse. 2011. "Castor Phospholipid:Diacylglycerol Acyltransferase Facilitates Efficient Metabolism of Hydroxy Fatty Acids in Transgenic Arabidopsis." *Plant Physiology* 155 (2): 683–93. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167239>.
- Escobar, Matthew A., and Abhaya M. Dandekar. 2003. "Agrobacterium Tumefaciens as an Agent of Disease." *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00162-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00162-6).
- Fehér, Attila. 2019. "Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology?" *Frontiers in Plant Science* 10 (April): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>.
- Ganesh Kumari, K., M. Ganesan, and N. Jayabalan. 2008. "Somatic Organogenesis and Plant Regeneration in *Ricinus Communis*." *Biologia Plantarum* 52 (1): 17–25. <https://doi.org/10.1007/s10535-008-0003-x>.
- Gelvin, S. B. 2003. "Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: The Biology behind the 'Gene-Jockeying' Tool." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (1): 16–37. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.1.16-37.2003>.
- Ghedira, Rim, Sylvie De Buck, Jonah Nolf, and Ann Depicker. 2013. "The Efficiency of Arabidopsis Thaliana Floral Dip Transformation Is Determined Not Only by the Agrobacterium Strain Used but Also by the Physiology and the Ecotype of the Dipped Plant." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26 (7): 823–32. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-12-0267-R>.
- Gil-Correal, Alejandro, Catalina Restrepo-Osorio, Javier Correa Álvarez, and Diego Fernando Villanueva-Mejía. 2019. "Direct in Vitro Regeneration of Castor Bean Plants (*Ricinus Communis*) Using Epicotyls." *Bioscience Journal* 35 (2): 347–55. <https://doi.org/10.14393/BJ-v35n2a2019-41475>.
- Gohlke, Jochen, and Rosalia Deeken. 2014. "Plant Responses to *Agrobacterium Tumefaciens* and Crown Gall Development." *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00155>.
- "Guidance on the Agronomic and Phenotypic Characterisation of Genetically Modified Plants."

2016. *EFSA Journal* 13 (6). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4128>.
- Guohua, Ma. 1998. "Effects of Cytokinins and Auxins on Cassava Shoot Organogenesis and Somatic Embryogenesis from Somatic Embryo Explants." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1023/A:1006065120629>.
- Hale, Caryn R., Peng Zhao, Sara Olson, Michael O. Duff, Brenton R. Graveley, Lance Wells, Rebecca M. Terns, and Michael P. Terns. 2009. "RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex." *Cell* 139 (5): 945–56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.040>.
- Hanahan, Douglas. 1983. "Studies on Transformation of Escherichia Coli with Plasmids." *Journal of Molecular Biology* 166 (4): 557–80. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8).
- Haque, Effi, Hiroaki Taniguchi, Md Mahmudul Hassan, Pankaj Bhowmik, M. Rezaul Karim, Magdalena Śmiech, Kaijun Zhao, Mahfuzur Rahman, and Tofazzal Islam. 2018. "Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technology for the Improvement of Crops Cultivated in Tropical Climates: Recent Progress, Prospects, and Challenges." *Frontiers in Plant Science* 9 (May): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00617>.
- Harwood, John L. 1996. "Recent Advances in the Biosynthesis of Plant Fatty Acids." *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*. Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(95\)00242-1](https://doi.org/10.1016/0005-2760(95)00242-1).
- Heigwer, Florian, Grainne Kerr, and Michael Boutros. 2014. "E-CRISP: Fast CRISPR Target Site Identification." *Nature Methods* 11 (2): 122–23. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2812>.
- Heppard, Elmer P., Anthony J. Kinney, Kevin L. Stecca, and Guo Hua Miao. 1996. "Developmental and Growth Temperature Regulation of Two Different Microsomal ω -6 Desaturase Genes in Soybeans." *Plant Physiology* 110 (1): 311–19. <https://doi.org/10.1104/pp.110.1.311>.
- Herrera-Estrella, A., M. Van Montagu, and K. Wang. 1990. "A Bacterial Peptide Acting as a Plant Nuclear Targeting Signal: The Amino-Terminal Portion of Agrobacterium VirD2 Protein Directs a β -Galactosidase Fusion Protein into Tobacco Nuclei." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (24): 9534–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.24.9534>.
- Hoekema, A., P. R. Hirsch, P. J.J. Hooykaas, and R. A. Schilperoort. 1983. "A Binary Plant Vector Strategy Based on Separation of Vir- and T-Region of the Agrobacterium Tumefaciens Ti-Plasmid." *Nature* 303 (5913): 179–80. <https://doi.org/10.1038/303179a0>.
- Horgan, R., E. W. Hewett, J. M. Horgan, J. Purse, and P. F. Wareing. 1975. "A New Cytokinin from Populus x Robusta." *Phytochemistry* 14 (4): 1005–8. [167](https://doi.org/10.1016/0031-
</div>
<div data-bbox=)

9422(75)85176-4.

- Horsch, Robert B., Robert T. Fraley, Stephen G. Rogers, Patricia R. Sanders, Alan Lloyd, and Nancy Hoffmann. 1984. "Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants." *Science* 223 (4635): 496–98. <https://doi.org/10.1126/science.223.4635.496>.
- Horvath, Philippe, Dennis A. Romero, Anne Claire Coûté-Monvoisin, Melissa Richards, Hélène Deveau, Sylvain Moineau, Patrick Boyaval, Christophe Fremaux, and Rodolphe Barrangou. 2008. "Diversity, Activity, and Evolution of CRISPR Loci in *Streptococcus Thermophilus*." *Journal of Bacteriology* 190 (4): 1401–12. <https://doi.org/10.1128/JB.01415-07>.
- Hsu, Patrick D., David A. Scott, Joshua A. Weinstein, F. Ann Ran, Silvana Konermann, Vineeta Agarwala, Yinqing Li, et al. 2013. "DNA Targeting Specificity of RNA-Guided Cas9 Nucleases." *Nature Biotechnology* 31 (9): 827–32. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>.
- Hu, Qiong, Sven B. Andersen, and Lise N. Hansen. 1999. "Plant Regeneration Capacity of Mesophyll Protoplasts from *Brassica Napus* and Related Species." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59 (3): 189–96. <https://doi.org/10.1023/A:1006417530587>.
- Hu, Xiaozhen, Jinlei Zhao, William F. DeGrado, and Andrew N. Binns. 2013. "Agrobacterium Tumefaciens Recognizes Its Host Environment Using ChvE to Bind Diverse Plant Sugars as Virulence Signals." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (2): 678–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215033110>.
- Hurtado M., Daniel V., and María Eugenia. Merino M. 1987. *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Editorial Trillas.
- HWANG, HAU-HSUAN, MING-HSUAN WANG, YING-LING LEE, YUN-LONG TSAI, YI-HO LI, FONG-JHIH YANG, YU-CHEN LIAO, SHAO-KAI LIN, and ERH-MIN LAI. 2010. "Agrobacterium-Produced and Exogenous Cytokinin-Modulated Agrobacterium-Mediated Plant Transformation." *Molecular Plant Pathology*, June, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00637.x>.
- Hwang, Hau-Hsuan, Manda Yu, and Erh-Min Lai. 2017. "Agrobacterium -Mediated Plant Transformation: Biology and Applications ." *The Arabidopsis Book* 15: e0186. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>.
- Hwang, Woong Y., Yanfang Fu, Deepak Reyon, Morgan L. Maeder, Shengdar Q. Tsai, Jeffry D. Sander, Randall T. Peterson, J. R. Joanna Yeh, and J. Keith Joung. 2013. "Efficient Genome Editing in Zebrafish Using a CRISPR-Cas System." *Nature Biotechnology* 31 (3): 227–29. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>.
- Ikeuchi, Momoko, Keiko Sugimoto, and Akira Iwase. 2013. "Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression." *Plant Cell*. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>.
- Jeong, Gwi Taek, and Don Hee Park. 2009. "Optimization of Biodiesel Production from Castor

- Oil Using Response Surface Methodology.” In *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 156:1–11. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8468-9>.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. “A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.” *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096): 816–21. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
- Jinek, Martin, Alexandra East, Aaron Cheng, Steven Lin, Enbo Ma, and Jennifer Doudna. 2013. “RNA-Programmed Genome Editing in Human Cells.” *ELife* 2 (January): e00471. <https://doi.org/10.7554/eLife.00471>.
- Kanemoto, R. H., A. T. Powell, D. E. Akiyoshi, D. A. Regier, R. A. Kerstetter, E. W. Nester, M. C. Hawes, and M. P. Gordon. 1989. “Nucleotide Sequence and Analysis of the Plant-Inducible Locus PinF from *Agrobacterium Tumefaciens*.” *Journal of Bacteriology* 171 (5): 2506–12. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2506-2512.1989>.
- Keane, P. J., A. Kerr, and P. B. New. 1970. “Crown Gall of Stone Fruit Ii. Identification and Nomenclature of *Agrobacterium* Isolates.” *Australian Journal of Biological Sciences* 23 (3): 585–96. <https://doi.org/10.1071/B19700585>.
- Kearns, Ellen V., Suzanne Hugly, and Chris R. Somerville. 1991. “The Role of Cytochrome B5 in $\Delta 12$ Desaturation of Oleic Acid by Microsomes of Safflower (*Carthamus Tinctorius* L.).” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 284 (2): 431–36. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90319-E](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90319-E).
- Komari, Toshihiko, Yuji Ishida, and Yukoh Hiei. 2004. “Plant Transformation Technology: *Agrobacterium* -Mediated Transformation.” In *Handbook of Plant Biotechnology*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470869143.kc014>.
- Kregten, Maartje Van, Beatrice I. Lindhout, Paul J.J. Hooykaas, and Bert J. Van Der Zaal. 2009. “*Agrobacterium*-Mediated T-DNA Transfer and Integration by Minimal VirD2 Consisting of the Relaxase Domain and a Type IV Secretion System Translocation Signal.” *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22 (11): 1356–65. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-11-1356>.
- Kreněk, Pavel, Olga Samajová, Ivan Luptovciak, Anna Daskocilová, George Komis, and Jozef Samaj. 2015. “Transient Plant Transformation Mediated by *Agrobacterium Tumefaciens*: Principles, Methods and Applications.” *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.012>.
- Kuluev, B. R., G. R. Gumerova, E. V. Mikhaylova, G. A. Gerashchenkov, N. A. Rozhnova, Z. R. Vershinina, A. V. Khyazev, et al. 2019. “Delivery of CRISPR/Cas Components into Higher Plant Cells for Genome Editing.” *Russian Journal of Plant Physiology* 66 (5): 694–706. <https://doi.org/10.1134/S102144371905011X>.

- Kumlehn, Jochen, Janine Pietralla, Goetz Hensel, Michael Pacher, and Holger Puchta. 2018. “The CRISPR/Cas Revolution Continues: From Efficient Gene Editing for Crop Breeding to Plant Synthetic Biology.” *Journal of Integrative Plant Biology*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jipb.12734>.
- Lacroix, Benoît, and Vitaly Citovsky. 2018. “Beyond Agrobacterium-Mediated Transformation: Horizontal Gene Transfer from Bacteria to Eukaryotes.” In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 418:443–62. Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/82_2018_82.
- Lacroix, Benoît, Tzvi Tzfira, Alexander Vainstein, and Vitaly Citovsky. n.d. “A Case of Promiscuity: Agrobacterium’s Endless Hunt for New Partners.” Accessed January 30, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.10.004>.
- Larebeke, N. Van, G. Engler, M. Holsters, S. Van Den Elsacker, I. Zaenen, R. A. Schilperoort, and J. Schell. 1974. “Large Plasmid in Agrobacterium Tumefaciens Essential for Crown Gall-Inducing Ability.” *Nature* 252 (5479): 169–70. <https://doi.org/10.1038/252169a0>.
- Lee, Chil Woo, Marina Efetova, Julia C. Engelmann, Robert Kramell, Claus Wasternack, Jutta Ludwig-Müller, Rainer Hedrich, and Rosalia Deeken. 2009. “Agrobacterium Tumefaciens Promotes Tumor Induction by Modulating Pathogen Defense in Arabidopsis Thaliana.” *Plant Cell* 21 (9): 2948–62. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064576>.
- Lee, Haeng S., Suk W. Kim, Kwang W. Lee, Tage Eriksson, and Jang R. Liu. 1995. “Agrobacterium-Mediated Transformation of Ginseng (Panax Ginseng) and Mitotic Stability of the Inserted β -Glucuronidase Gene in Regenerants from Isolated Protoplasts.” *Plant Cell Reports* 14 (9): 545–49. <https://doi.org/10.1007/BF00231935>.
- Lee, Yong Woog, Shouguang Jin, Woong Seop Sim, and Eugene W. Nester. 1996. “The Sensing of Plant Signal Molecules by Agrobacterium: Genetic Evidence for Direct Recognition of Phenolic Inducers by the VirA Protein.” *Gene* 179 (1): 83–88. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00328-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00328-9).
- Lemmon, Zachary H., Nathan T. Reem, Justin Dalrymple, Sebastian Soyk, Kerry E. Swartwood, Daniel Rodriguez-Leal, Joyce Van Eck, and Zachary B. Lippman. 2018. “Rapid Improvement of Domestication Traits in an Orphan Crop by Genome Editing.” *Nature Plants* 4 (10): 766–70. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0259-x>.
- Lessl, M, and E Lanka. 1994. “Common Mechanisms in Bacterial Conjugation and Ti-Mediated T-DNA Transfer to Plant Cells.” *Cell* 77 (3): 321–24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90146-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90146-5).
- Li, Shan, Songmei Liu, Yanhua Liu, Haiping Lu, Yuanyuan Tan, Jianzhong Huang, Pengcheng Wei, and Qing Yao Shu. 2018. “HRM-Facilitated Rapid Identification and Genotyping of Mutations Induced by CRISPR/ Cas9 Mutagenesis in Rice.” *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 18 (2): 184–91. <https://doi.org/10.1590/1984-70332018v18n2a26>.

- Lian, Yu Ji, Xiao Mei Zhao, Guang Zhe Lin, and Hak tae Lim. 2012. “Protoplast Isolation and Culture for Somatic Hybridisation of Rapid Cycling Brassica Rapa with ‘Anand’ CMS and Brassica Juncea.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109 (3): 565–72.
<https://doi.org/10.1007/s11240-012-0114-0>.
- Lin, Choun Sea, Chen Tran Hsu, Ling Hung Yang, Lan Ying Lee, Jin Yuan Fu, Qiao Wei Cheng, Fu Hui Wu, et al. 2018. “Application of Protoplast Technology to CRISPR/Cas9 Mutagenesis: From Single-Cell Mutation Detection to Mutant Plant Regeneration.” *Plant Biotechnology Journal*, 2018. <https://doi.org/10.1111/pbi.12870>.
- Lin, Jiann-Tsyh, and Arthur Arcinas. 2007. “Regiospecific Analysis of Diricinoleoylacylglycerols in Castor (*Ricinus Communis* L.) Oil by Electrospray Ionization–Mass Spectrometry.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (6): 2209–16. <https://doi.org/10.1021/jf063105f>.
- Liu, Pu, and Eugene W. Nester. 2006. “Indoleacetic Acid, a Product of Transferred DNA, Inhibits Vir Gene Expression and Growth of Agrobacterium Tumefaciens C58.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (12): 4658–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600366103>.
- Liu, Ying, Yingbin Xue, Jianian Tang, Jianping Chen, and Miao Chen. 2019. “Ef Fi Cient Mesophyll Protoplast Isolation and Development of a Transient Expression System for Castor-Oil Plant (*Ricinus Communis* L .).” <https://doi.org/10.1556/019.70.2019.02>.
- Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. 2001. “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method.” *Methods* 25 (4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lloyd, Gregory, and Brent McCown. 1980. “Commercially-Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, Kalmia Latifolia, by Use of Shoot Tip Culture.” *International Plant Propagators’ Society Proceedings* 30.
- Lochlainn, Seosamh T., Stephen Amoah, Neil S. Graham, Khalid Alamer, Juan J. Rios, Smita Kurup, Andrew Stoute, et al. 2011. “High Resolution Melt (HRM) Analysis Is an Efficient Tool to Genotype EMS Mutants in Complex Crop Genomes.” *Plant Methods* 7 (1): 43. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-43>.
- Loo, F. J. van de, P. Broun, S. Turner, and C. Somerville. 1995. “An Oleate 12-Hydroxylase from Ricinus Communis L. Is a Fatty Acyl Desaturase Homolog.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (15): 6743–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.6743>.
- Loo, Frank J. Van De, Pierre Broun, Simon Turner, and Chris Somerville. 1995. “An Oleate 12-Hydroxylase from Ricinus Communis L. Is a Fatty Acyl Desaturase Homolog.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (15): 6743–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.6743>.

- Lu, Chaofu, James G. Wallis, and John Browse. 2007. "An Analysis of Expressed Sequence Tags of Developing Castor Endosperm Using a Full-Length CDNA Library." *BMC Plant Biology* 7: 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-42>.
- Mahmoud, Sameer N, and Nabeel K Al-Ani. 2016. "Effect of Different Sterilization Methods on Contamination and Viability of Nodal Segments of Cestrum NocturnumL." *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)* 4 (1): 4–9. <https://doi.org/10.20431/2349-0365.0401002>.
- Makarova, Kira S., Daniel H. Haft, Rodolphe Barrangou, Stan J.J. Brouns, Emmanuelle Charpentier, Philippe Horvath, Sylvain Moineau, et al. 2011. "Evolution and Classification of the CRISPR-Cas Systems." *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>.
- Mali, Prashant, Luhan Yang, Kevin M Esvelt, John Aach, Marc Guell, James E DiCarlo, Julie E Norville, and George M Church. 2013. "RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9." *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121): 823–26. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>.
- Marraffini, Luciano A., and Erik J. Sontheimer. 2008. "CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA." *Science* 322 (5909): 1843–45. <https://doi.org/10.1126/science.1165771>.
- Martineau, B., T. A. Voelker, and R. A. Sanders. 1994. "On Defining T-DNA." *The Plant Cell*, August, 1032–33. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.8.1032>.
- McKeon, T A, G Q Chen, and J T Lin. 2000. "Biochemical Aspects of Castor Oil Biosynthesis." *Biochemical Society Transactions* 28 (6): 972–74.
- Mederos Molina, Sebastiana, and Christian Schobert. 1995. "Micropropagation of Ricinus Communis." *Journal of Plant Physiology* 147 (2): 270–72. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81517-8](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81517-8).
- Metje-Sprink, Janina, Thorben Sprink, and Frank Hartung. 2020. "Genome-Edited Plants in the Field." *Current Opinion in Biotechnology* 61: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.08.007>.
- Miquel, M., and J. Browse. 1992. "Arabidopsis Mutants Deficient in Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis: Biochemical and Genetic Characterization of a Plant Oleoyl-Phosphatidylcholine Desaturase." *Journal of Biological Chemistry* 267 (3): 1502–9.
- Miquel, Martine, and J Browse. 1992. "Arabidopsis Mutants Deficient in Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis. Biochemical and Genetic Characterization of a Plant Oleoyl-Phosphatidylcholine Desaturase." *Journal of Biological Chemistry* 267 (3): 1502–9. <http://www.jbc.org/content/267/3/1502.abstract>.

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9

- Modrzejewski, Dominik, Frank Hartung, Thorben Sprink, Dörthe Krause, Christian Kohl, and Ralf Wilhelm. 2019. “What Is the Available Evidence for the Range of Applications of Genome-Editing as a New Tool for Plant Trait Modification and the Potential Occurrence of Associated off-Target Effects: A Systematic Map.” *Environmental Evidence* 8 (1). <https://doi.org/10.1186/s13750-019-0171-5>.
- Moreau, Robert A., and Paul K. Stumpf. 1981. “Recent Studies of the Enzymic Synthesis of Ricinoleic Acid by Developing Castor Beans.” *Plant Physiology* 67 (4): 672–76. <https://doi.org/10.1104/pp.67.4.672>.
- Mroginski, LA, and William M. Roca. 1991. “Establecimiento de Cultivos de Tejidos Vegetales in Vitro.”
- Naito, Yuki, Kimihiro Hino, Hidemasa Bono, and Kumiko Ui-Tei. 2015a. “CRISPRdirect: Software for Designing CRISPR/Cas Guide RNA with Reduced off-Target Sites.” *Bioinformatics* 31 (7): 1120–23. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu743>.
- . 2015b. “CRISPRdirect: Software for Designing CRISPR/Cas Guide RNA with Reduced off-Target Sites.” *Bioinformatics* 31 (7): 1120–23. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu743>.
- Nakamura, Manabu T., and Takayuki Y. Nara. 2004. “STRUCTURE, FUNCTION, AND DIETARY REGULATION OF $\Delta 6$, $\Delta 5$, AND $\Delta 9$ DESATURASES.” *Annual Review of Nutrition* 24 (1): 345–76. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.121803.063211>.
- Nanjareddy, Kalpana, Lourdes Blanco, Manoj Kumar Arthikala, Xóchitl Alvarado-Affantranger, Carmen Quinto, Federico Sánchez, and Miguel Lara. 2016. “A Legume TOR Protein Kinase Regulates Rhizobium Symbiosis and Is Essential for Infection and Nodule Development.” *Plant Physiology* 172 (3): 2002–20. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00844>.
- Narasimhulu, S B, X B Deng, R Sarria, and S B Gelvin. 1996. “Early Transcription of Agrobacterium T-DNA Genes in Tobacco and Maize.” *The Plant Cell* 8 (5): 873–86. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.5.873>.
- Nishimura, Mikio, and Harry Beevers. n.d. “Isolation of Intact Plastids from Protoplasts from Castor Bean Endosperm.” *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists (ASPB). Accessed January 30, 2020. <https://doi.org/10.2307/4265367>.
- . 1978. “Hydrolases in Vacuoles from Castor Bean Endosperm.” *Plant Physiology* 62 (1): 44–48. <https://doi.org/10.1104/pp.62.1.44>.
- Nonaka, Satoko, Ken-Ichi Yuhashi, Keita Takada, Masayuki Sugaware, Kiwamu Minamisawa, and Hiroshi Ezura. 2008. “Ethylene Production in Plants during Transformation Suppresses Vir Gene Expression in *Agrobacterium Tumefaciens*.” *New Phytologist* 178 (3): 647–56. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02400.x>.

- Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9
- Ogunniyi, D. S. 2006. “Castor Oil: A Vital Industrial Raw Material.” *Bioresource Technology* 97 (9): 1086–91. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.028>.
- Pellegrino, Elisa, Stefano Bedini, Marco Nuti, and Laura Ercoli. 2018. “Impact of Genetically Engineered Maize on Agronomic, Environmental and Toxicological Traits: A Meta-Analysis of 21 Years of Field Data.” *Scientific Reports* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21284-2>.
- Perez Ponce, J.N, Y Alvarado, J Pérez, P Orellana, J.N. Pérez-Asensio, DE LA SERNA J PEREZ, D. Agramonte, et al. 1998. “Propagación y Mejora Genética de Plantas Por Biotecnología.”
- Perry, Bruce A. 1943. “CHROMOSOME NUMBER AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS IN THE EUPHORBACEAE.” *American Journal of Botany* 30 (7): 527–43. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1943.tb14796.x>.
- Pfaffl, Michael W, Ales Tichopad, Christian Prgomet, and Tanja P Neuvians. 2004. “Determination of Stable Housekeeping Genes, Differentially Regulated Target Genes and Sample Integrity: BestKeeper-Excel-Based Tool Using Pair-Wise Correlations.” *Biotechnology Letters*. Vol. 26. <http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/bestkeeper.html>.
- Pierik, R.L.M. 1990. “Cultivo in Vitro de Las Plantas Superiores.” *Ediciones Mundi Prensa, Madrid, Spain*.
- Pitzschke, Andrea, and Helene Persak. 2012. “Poinsettia Protoplasts - a Simple, Robust and Efficient System for Transient Gene Expression Studies.” *Plant Methods* 8 (1). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-14>.
- Rampadarath, Sillma, and Daneshwar Puchooa. 2016. “In Vitro Antimicrobial and Larvicidal Properties of Wild *Ricinus Communis* L. in Mauritius.” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6 (2): 100–107.
- Rao, K Sankara, and A H Prakash. 1995. “A Simple Method for the Isolation of Plant Protoplasts.” *J. Biosci.* Vol. 20.
- Reed, Gudrun H., Jana O. Kent, and Carl T. Wittwer. 2007. “High-Resolution DNA Melting Analysis for Simple and Efficient Molecular Diagnostics.” *Pharmacogenomics* 8 (6): 597–608. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.6.597>.
- Richards, Donald Earl, Rebecca D. Taylor, and Denis J. Murphy. 1993. “Localization and Possible Substrate Requirement of the Oleate 12-Hydroxylase of Developing *Ricinus Communis* Seeds.”
- Ricroch, Agnès, Pauline Clairand, and Wendy Harwood. 2017. “Use of CRISPR Systems in Plant Genome Editing: Toward New Opportunities in Agriculture.” *Emerging Topics in Life*

- Sciences* 1 (2): 169–82. <https://doi.org/10.1042/etls20170085>.
- Roberts, L M, F I Lamb, D J Pappin, and J M Lord. 1985. “The Primary Sequence of Ricinus Communis Agglutinin. Comparison with Ricin.” *The Journal of Biological Chemistry* 260 (29): 15682–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999130>.
- Roth, D. B., and J. H. Wilson. 1985. “Relative Rates of Homologous and Nonhomologous Recombination in Transfected DNA.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (10): 3355–59. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.10.3355>.
- Schindele, Angelina, Annika Dorn, and Holger Puchta. 2020. “CRISPR/Cas Brings Plant Biology and Breeding into the Fast Lane.” *Current Opinion in Biotechnology* 61: 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.08.006>.
- Schmidt, Hermann, Thomas Dresselhaus, Friedrich Buck, and Ernst Heinz. 1994. “Purification and PCR-Based cDNA Cloning of a Plastidial n-6 Desaturase.” *Plant Molecular Biology* 26 (2): 631–42. <https://doi.org/10.1007/BF00013749>.
- Schrammeijer, B, E Risseuw, W Pansegrau, T J Regensburg-Tuink, W L Crosby, and P J Hooykaas. 2001. “Interaction of the Virulence Protein VirF of *Agrobacterium Tumefaciens* with Plant Homologs of the Yeast Skp1 Protein.” *Current Biology : CB* 11 (4): 258–62. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00069-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00069-0).
- Shan, Qiwei, Yanpeng Wang, Jun Li, Yi Zhang, Kunling Chen, Zhen Liang, Kang Zhang, et al. 2013. “Targeted Genome Modification of Crop Plants Using a CRISPR-Cas System.” *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nbt.2650>.
- Shimoda, N, A Toyoda-Yamamoto, S Aoki, and Y Machida. 1993. “Genetic Evidence for an Interaction between the VirA Sensor Protein and the ChvE Sugar-Binding Protein of *Agrobacterium*.” *The Journal of Biological Chemistry* 268 (35): 26552–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8253785>.
- Shmakov, Sergey, Omar O. Abudayyeh, Kira S. Makarova, Yuri I. Wolf, Jonathan S. Gootenberg, Ekaterina Semenova, Leonid Minakhin, et al. 2015. “Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems.” *Molecular Cell* 60 (3): 385–97. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.008>.
- Simko, Ivan. 2016. “High-Resolution DNA Melting Analysis in Plant Research.” *Trends in Plant Science* 21 (6): 528–37. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.004>.
- Singer, Kamy Kalman. 2013. “T-DNA Integration during *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Plants.”
- Slabas, Antoni R., and Tony Fawcett. 1992. “The Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipid Biosynthesis.” *Plant Molecular Biology* 19 (1): 169–91. <https://doi.org/10.1007/BF00015613>.

- Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9
- Smith, Erwin F., and C. O. Townsend. 1907. “A Plant-Tumor of Bacterial Origin.” *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.25.643.671>.
- Smith, J. 2001. “The Influence of DNA Double-Strand Break Structure on End-Joining in Human Cells.” *Nucleic Acids Research* 29 (23): 4783–92.
<https://doi.org/10.1093/nar/29.23.4783>.
- Smith, M. A., L. Jonsson, S. Stymne, and K. Stobart. 1992. “Evidence for Cytochrome B5 as an Electron Donor in Ricinoleic Acid Biosynthesis in Microsomal Preparations from Developing Castor Bean (*Ricinus Communis* L.).” *Biochemical Journal* 287 (1): 141–44.
<https://doi.org/10.1042/bj2870141>.
- Smith, Mark A., Hangsik Moon, Gangamma Chowrira, and Ljerka Kunst. 2003. “Heterologous Expression of a Fatty Acid Hydroxylase Gene in Developing Seeds of Arabidopsis Thaliana.” *Planta* 217 (3): 507–16. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1015-6>.
- Soares, Douglas Moraes Mendel, Mariana Cansian Sattler, Marcia Flores da Silva Ferreira, and Milene Miranda Praça-Fontes. 2016. “Assessment of Genetic Stability in Three Generations of In Vitro Propagated *Jatropha Curcas* L. Plantlets Using ISSR Markers.” *Tropical Plant Biology* 9 (4): 229–38. <https://doi.org/10.1007/s12042-016-9171-6>.
- Solórzano-Cascante, Paúl, Neiva Sánchez-Chiang, and Víctor M. Jiménez. 2018. “Explant Type, Culture System, 6-Benzyladenine, Meta-Topolin and Encapsulation Affect Indirect Somatic Embryogenesis and Regeneration in *Carica Papaya* L.” *Frontiers in Plant Science* 871 (December): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01769>.
- Sparkes, Imogen A., John Runions, Anne Kearns, and Chris Hawes. 2006. “Rapid, Transient Expression of Fluorescent Fusion Proteins in Tobacco Plants and Generation of Stably Transformed Plants.” *Nature Protocols* 1 (4): 2019–25.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.286>.
- Stachel, Scott E., Eric Messens, Marc Van Montagu, and Patricia Zambryski. 1985. “Identification of the Signal Molecules Produced by Wounded Plant Cells That Activate T-DNA Transfer in *Agrobacterium Tumefaciens*.” *Nature* 318 (6047): 624–29.
<https://doi.org/10.1038/318624a0>.
- Stoutjesdijk, Peter A., Surinder P. Singh, Qing Liu, Clive J. Hurlstone, Peter A. Waterhouse, and Allan G. Green. 2002. “HpRNA-Mediated Targeting of the Arabidopsis FAD2 Gene Gives Highly Efficient and Stable Silencing.” *Plant Physiology* 129 (4): 1723–31.
<https://doi.org/10.1104/pp.006353>.
- Strauss, Steven H, and Joanna K Sax. 2016. “Ending Event-Based Regulation of GMO Crops.” *Nature Biotechnology* 34 (5): 474–77. <https://doi.org/10.1038/nbt.3541>.
- Subramoni, Sujatha, Naeem Nathoo, Eugene Klimov, and Ze Chun Yuan. 2014. “*Agrobacterium*

Mejoramiento genético de la especie *Ricinus communis* mediante técnicas de biotecnología moderna con la tecnología CRISPR/Cas9

Tumefaciens Responses to Plant-Derived Signaling Molecules.” *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00322>.

Sujatha, M., T. P. Reddy, and M. J. Mahasi. 2008a. “Role of Biotechnological Interventions in the Improvement of Castor (*Ricinus Communis* L.) and *Jatropha Curcas* L.” *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.004>.

———. 2008b. “Role of Biotechnological Interventions in the Improvement of Castor (*Ricinus Communis* L.) and *Jatropha Curcas* L.” *Biotechnology Advances* 26 (5): 424–35. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.004>.

Sujatha, M, H P S Makkar, and K Becker. 2005. “Shoot Bud Proliferation from Axillary Nodes and Leaf Sections of Non-Toxic *Jatropha Curcas* L.” *Plant Growth Regulation* 47 (1): 83–90. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-0859-0>.

Sujatha, M, and T P Reddy. 1998. “Differential Cytokinin Effects on the Stimulation of in Vitro Shoot Proliferation from Meristematic Explants of Castor (*Ricinus Communis* L.).” *Plant Cell Reports* 17 (6): 561–66. <https://doi.org/10.1007/s002990050442>.

Taylor, Sean, Rachel Scott, Richard Kurtz, Carl Fisher, and Viresh Patel. 2009. “A Practical Guide to High Resolution Melt Analysis Genotyping.” *Bio-Rad Laboratories Technical Note*. <http://www.americanbiotechnologist.com/blog/wp-content/uploads/2010/10/HRM-tech-note.pdf>.

Terns, Rebecca M., and Michael P. Terns. 2014. “CRISPR-Based Technologies: Prokaryotic Defense Weapons Repurposed.” *Trends in Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.01.003>.

Thomas, Thuruthiyil Dennis, and Rakhi Chaturvedi. 2008. “Endosperm Culture: A Novel Method for Triploid Plant Production.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9336-6>.

Thurtle-Schmidt, Deborah M., and Te Wen Lo. 2018. “Molecular Biology at the Cutting Edge: A Review on CRISPR/CAS9 Gene Editing for Undergraduates.” *Biochemistry and Molecular Biology Education* 46 (2): 195–205. <https://doi.org/10.1002/bmb.21108>.

Tian, Shouwei, Linjian Jiang, Qiang Gao, Jie Zhang, Mei Zong, Haiying Zhang, Yi Ren, et al. 2017. “Efficient CRISPR/Cas9-Based Gene Knockout in Watermelon.” *Plant Cell Reports* 36 (3): 399–406. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2089-5>.

Tudses, Nootjaree, Siripong Premjet, and Duangporn Premjet. 2014. “Optimal Conditions for High-Yield Protoplast Isolations of *Jatropha Curcas* L . And *Ricinus Communis* L Optimal Conditions for High-Yield Protoplast Isolations Of,” no. May. <https://doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2014.14.03.12313>.

———. 2015. “Establishment of Method for Protoplast Fusion with PEG-Mediated between

Jatropha Curcas L. and *Ricinus Communis* L.,” no. January.

- Vanaja, M., M. Jyothi, P. Ratnakumar, P. Vagheera, P. Raghuram Reddy, N. Jyothi Lakshmi, S.K. Yadav, M. Maheshwari, and B. Venkateswarlu. 2018. “Growth and Yield Responses of Castor Bean (*Ricinus Communis* L.) at Two Enhanced CO₂ Levels.” *Plant, Soil and Environment* 54 (No. 1): 38–46. <https://doi.org/10.17221/386-pse>.
- Vandesompele, J., Katleen De Preter, Filip Pattyn, Bruce Poppe, Nadine Van Roy, Anne De Paepe, and Frank Speleman. 2002. “Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes.” *Genome Biology* 3 (7). <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.
- Vergunst, Annette C., Miranda C.M. Van Lier, Amke Den Dulk-Ras, Thomas A. Grosse Stüve, Anette Ouwehand, and Paul J.J. Hooykaas. 2005. “Positive Charge Is an Important Feature of the C-Terminal Transport Signal of the VirB/D4-Translocated Proteins of *Agrobacterium*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (3): 832–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406241102>.
- Vijayakumar, Jeyachandran, Ponnirul Ponmanickam, P. Samuel, D. N. P. Sudarmani, and J. Pandiarajan. 2017. “Influence of Meta-Topolin on Efficient Plant Regeneration via Micropropagation and Organogenesis of Safflower (<I>Carthamus Tinctorius</I> L.) Cv. NARI-H-15.” *American Journal of Plant Sciences* 08 (04): 688–705. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.84048>.
- Villanueva-Mejía, Diego F. 2018. “Modern Biotechnology for Agricultural Development in Colombia.” *Ingeniería y Ciencia* 14 (28): 169–94. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.14.28.7>.
- Virts, E. L., and S. B. Gelvin. 1985. “Analysis of Transfer of Tumor-Inducing Plasmids from *Agrobacterium Tumefaciens* to *Petunia* Protoplasts.” *Journal of Bacteriology* 162 (3): 1030–38.
- Wang, Lijun, Xiaoling Jiang, Lei Wang, Wei Wang, Chunling Fu, Xingchu Yan, and Xinxin Geng. 2019a. “A Survey of Transcriptome Complexity Using PacBio Single-Molecule Real-Time Analysis Combined with Illumina RNA Sequencing for a Better Understanding of Ricinoleic Acid Biosynthesis in *Ricinus Communis*.” *BMC Genomics* 20 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5832-9>.
- . 2019b. “A Survey of Transcriptome Complexity Using PacBio Single-Molecule Real-Time Analysis Combined with Illumina RNA Sequencing for a Better Understanding of Ricinoleic Acid Biosynthesis in *Ricinus Communis*.” *BMC Genomics* 20 (1): 456. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5832-9>.
- Wang, Tim, Jenny J Wei, David M Sabatini, and Eric S Lander. 2014. “Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System.” *Science* 343 (6166): 80 LP – 84.

<https://doi.org/10.1126/science.1246981>.

Weber, Hans. 2002. “Fatty Acid-Derived Signals in Plants.” *Trends in Plant Science* 7 (5): 217–24. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02250-1](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02250-1).

Wiedenheft, Blake, Esther Van Duijn, Jelle Bultema, Saktham Waghmare, Kaihong Zhou, Arjan Barendregt, Wiebke Westphal, et al. 2011. “RNA-Guided Complex from a Bacterial Immune System Enhances Target Recognition through Seed Sequence Interactions.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (25): 10092–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102716108>.

Willig, Christopher J., Kaixuan Duan, and Zhanyuan J. Zhang. 2018. “Transcriptome Profiling of Plant Genes in Response to *Agrobacterium Tumefaciens*-Mediated Transformation.” In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 418:319–48. Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/82_2018_115.

Wojciechowska-Durczyńska, Katarzyna, Kinga Krawczyk-Rusiecka, Anna Cyniak-Magierska, Arkadiusz Zygmunt, Elżbieta Gałęcka, and Andrzej Lewiński. 2010. “Relative Quantification of PIK3CA Gene Expression Level in Fine-Needle Aspiration Biopsy Thyroid Specimens Collected from Patients with Papillary Thyroid Carcinoma and Non-Toxic Goitre by Real-Time RT-PCR.” *Thyroid Research* 3 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/1756-6614-3-5>.

Woo, Je Wook, Jungeun Kim, Soon Il Kwon, Claudia Corvalán, Seung Woo Cho, Hyeran Kim, Sang Gyu Kim, Sang Tae Kim, Sunghwa Choe, and Jin Soo Kim. 2015. “DNA-Free Genome Editing in Plants with Preassembled CRISPR-Cas9 Ribonucleoproteins.” *Nature Biotechnology* 33 (11): 1162–64. <https://doi.org/10.1038/nbt.3389>.

Wu, Jun Zheng, Qin Liu, Xiao Shan Geng, Kai Mian Li, Li Juan Luo, and Jin Ping Liu. 2017. “Highly Efficient Mesophyll Protoplast Isolation and PEG-Mediated Transient Gene Expression for Rapid and Large-Scale Gene Characterization in Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz).” *BMC Biotechnology*. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0349-2>.

Yao, Liping, Xiong Liao, Zhizhe Gan, Xiang Peng, Peng Wang, Shaojuan Li, and Tianhong Li. 2016. “Protoplast Isolation and Development of a Transient Expression System for Sweet Cherry (*Prunus Avium* L.).” *Scientia Horticulturae* 209 (September): 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.003>.

Yoo, Sang Dong, Young Hee Cho, and Jen Sheen. 2007. “*Arabidopsis* Mesophyll Protoplasts: A Versatile Cell System for Transient Gene Expression Analysis.” *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199>.

Young, C., and E. W. Nester. 1988. “Association of the VirD2 Protein with the 5’ End of T Strands in *Agrobacterium Tumefaciens*.” *Journal of Bacteriology* 170 (8): 3367–74. <https://doi.org/10.1128/jb.170.8.3367-3374.1988>.

- Zastrow-Hayes, Gina M., Haining Lin, Amy L. Sigmund, Jenna L. Hoffman, Clara M. Alarcon, Kevin R. Hayes, Todd A. Richmond, Jeffery A. Jeddeloh, Gregory D. May, and Mary K. Beatty. 2015. “Southern-by-Sequencing: A Robust Screening Approach for Molecular Characterization of Genetically Modified Crops.” *Plant Genome* 8 (1). <https://doi.org/10.3835/plantgenome2014.08.0037>.
- Zetsche, Bernd, Jonathan S. Gootenberg, Omar O. Abudayyeh, Ian M. Slaymaker, Kira S. Makarova, Patrick Essletzbichler, Sara E. Volz, et al. 2015. “Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System.” *Cell* 163 (3): 759–71. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>.
- Zhang, Ji Xing, Xiao Yu Wang, Zi Zhou Feng, Xue Jun Geng, Sha Moli Mu, Hong Yan Huo, Huan Tong, et al. 2016. “In Vitro Establishment of a Highly Effective Method of Castor Bean (*Ricinus Communis* L.) Regeneration Using Shoot Explants.” *Journal of Integrative Agriculture* 15 (6): 1417–22. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61286-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61286-2).
- Zhi, Li, Susan TeRonde, Sandra Meyer, Maren L. Arling, James C. Register, Zuo Yu Zhao, Todd J. Jones, and Ajith Anand. 2015. “Effect of Agrobacterium Strain and Plasmid Copy Number on Transformation Frequency, Event Quality and Usable Event Quality in an Elite Maize Cultivar.” *Plant Cell Reports* 34 (5): 745–54. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1734-0>.

4.Recomendaciones y sugerencias finales.

1. Para mejorar los procesos de regeneración de callos vía organogénesis en *R. communis*, se debería plantear una matriz con más niveles de fitohormonas y en especial con la meta-Topolina puesto que dio buenos indicios de regeneración en este tejido para esta especie, así mismo, poder establecer frecuencias de sub-cultivos menores para evitar un poco la fenolización de los tejidos y mejorar los procesos de organogénesis.
2. Lograr establecer un panorama de redes metabólicas para la especie *R. communis* más holístico dónde se estudie mucho mejor los niveles de expresión de las enzimas FAH12 y FAD2 en el estado vegetativo de la planta, de tal manera que al realizar una edición en el gen FAD2 no se interrumpan procesos vitales de desarrollo de la planta.
3. Proponer nuevos sgRNA dirigidos al gen FAD2, de tal manera que aumenten la probabilidad de generar eventos de mutación en *R. communis*. Adicionalmente, se propone que estos nuevos sgRNA se sometan a nuevas plataformas para el diseño de los mismos, puesto que ya se han actualizado los algoritmos para encontrar menores eventos de *off-target* en Crispr/Cas9.
4. Con respecto al plásmido CRISPRPL que se transfiere a la planta mediante *A. tumefaciens*, se sugiere cambiar el marcador de selección vegetal, por uno de tipo herbicida, como el glufosinato de amonio, puesto que permite evaluar de manera más rápida las plantas que fueron transformadas de manera exitosa.
5. Diseñar nuevos primers para la amplificación de las regiones editadas en el gen FAD2 de *R. communis*, que permitan generar amplicones de mayor tamaño, que facilite la secuenciación y posterior análisis en las posibles regiones editadas de este gen.