



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA MOLECULAR
CON EL SISTEMA CRISPR-Cas13 PARA EL
PROCESAMIENTO DE ARN EN PLANTAS**

Tesis para obtener el título de:

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

GUSTAVO ADOLFO GONZÁLEZ FRANCO

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. CARLOS ALBERTO CONTRERAS PAREDES



ENERO 2026

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
MÁRCO TEÓRICO.....	9
Sistema CRISPR-Cas.....	9
Tipos de sistemas CRISPR-Cas conocidos	11
Sistema CRISPR-Cas clase 1.....	12
Sistema CRIPR-Cas clase 2	12
Sistema CRISPR-Cas13	13
Cas13a.....	14
Cas13b.....	14
Cas13c.....	15
Cas13d.....	15
Estructura del ARNcr utilizado por el sistema CRISPR-Cas13	15
Mecanismo de acción de CRISPR-Cas13	16
Procesamiento de ARN mediante CRISPR-Cas13	17
Antecedentes del uso de CRISPR-Cas13 en el control de enfermedades virales en plantas	20
Ventajas y limitantes del uso de CRISPR-Cas13 ante otros sistemas CRISPR-Cas.....	22
ARN de interferencia (ARNi): otra tecnología para el procesamiento de ARN	22
Aspectos bioéticos sobre el uso de CRISPR-Cas y el procesamiento de ARN	23
JUSTIFICACIÓN	24
OBJETIVOS	25
METODOLOGÍA	26
Obtención de fragmentos de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	26
Desarrollo del constructo NOS:ARNg.....	27
Clonación de los fragmentos de interés en el plásmido de expresión	28
Clonación de constructo NOS:ARNg.....	28
Clonación de la secuencia codificante de Cas13	29
Preparación de células bacterianas competentes.....	30
Obtención de células competentes de <i>Agrobacterium</i>	31

Transformación bacteriana con el plásmido clonado	31
Extracción de plásmido a partir de bacterias transformadas	32
Prueba de PCR para identificar fragmentos de interés	33
Prueba de digestión enzimática para verificar la presencia y el sentido de Cas13	33
Verificación de identidad de constructo mediante secuenciación	34
Transformación de plantas de tabaco (<i>Nicotina tabacum</i>) con la plataforma construida mediante agroinfiltración con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
Obtención de ARN total a partir de plantas de <i>Nicotina tabacum</i> transformadas	35
Obtención de ADNc a partir de ARN total	35
Amplificación de ARNg y Cas13 a partir de ADNc construido	35
RESULTADOS	37
Obtención de fragmentos de interés ARNg y promotor NOS	37
Desarrollo del constructo NOS:ARNg	37
Clonación de los fragmentos de interés en el plásmido de expresión y transformación bacteriana	38
Prueba de digestión enzimática para verificar la presencia y el sentido de Cas13	43
Verificación de la identidad del constructo mediante secuenciación	44
Transformación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	47
Transformación de plantas de <i>Nicotina tabacum</i> con la plataforma construida mediante agroinfiltración con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48
Extracción de ARN total a partir de plantas de <i>Nicotina tabacum</i> transformadas	50
Evaluación de la expresión de Cas13 y ARNg en plantas de <i>Nicotina tabacum</i> transformadas	50
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
Construcción de plataforma de expresión	52
Expresión del sistema en tabaco	53
CONCLUSIÓN	55
REFERENCIAS	57
ANEXOS	64

Dedico este trabajo a todas las personas que me brindaron las experiencias necesarias para llegar hasta aquí, profesores y profesoras de todos los niveles, mi familia, amigos y gente con la que simplemente he coincidido. Haber escogido el camino de la ciencia ha sido una de las mejores decisiones de mi vida y a pesar de todos los altibajos por los que he pasado y pasaré, no me arrepiento de nada.

RESUMEN

El sistema CRISPR-Cas se ha convertido en una herramienta novedosa para la edición de sitios específicos de genomas al tener una actividad dirigida por moléculas de ARN guía, siendo el más conocido CRISPR-Cas9, sin embargo, existen otros sistemas que involucran otras proteínas Cas, tal es el caso de Cas13, cuya actividad es dirigida a ARN, lo que ha dado lugar a investigaciones sobre su uso en mecanismos moleculares que involucren la regulación a nivel transcriptómico. Este trabajo tiene como objetivo desarrollar una plataforma molecular que contenga los componentes necesarios para el funcionamiento del sistema CRISPR-Cas13 en plantas.

Para la construcción de la plataforma se amplificaron por PCR el promotor NOS, la secuencia correspondiente al ARNg y la secuencia codificante de Cas13, las cuales fueron integradas por ligación al plásmido de expresión para plantas PHD-m-Cherry, con el cual se transformó a la bacteria *Escherichia coli* cepa DH5 α CT, se realizó la selección de colonias transformantes y la extracción de plásmidos recombinantes; para corroborar la construcción genética realizada, se amplificaron de los fragmentos correspondientes al promotor NOS, el ARNg y el gen Cas13, además de verificarse su identidad mediante secuenciación y comparación mediante Blast y alineamiento de secuencias, una vez hecha dicha comprobación, se realizó la transformación de una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* con la cual se transformaron por agroinfiltración plantas de *Nicotiana tabacum* para comprobar la transcripción del gen Cas13.

Los datos sugieren que se logró construir una plataforma con los elementos necesarios para el funcionamiento del sistema CRISPR-Cas13 para plantas y se han obtenido pruebas que sugieren que las plantas transformadas son capaces de expresar dicha plataforma.

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, el ARN sufre modificaciones antes de ser completamente funcional, una vez que es sintetizado a partir de una cadena molde de ADN. En organismos eucariotas, como las plantas, el ARN sufre distintos procesos que dan como resultado un ARN maduro, como lo son la adición de la *CAP* 5', el corte y empalme, en el que son eliminados los intrones, donde también puede ocurrir el empalme alternativo, dando origen a proteínas con características distintas a partir de un mismo gen, y la poliadenilación del extremo 3' (Marquardt *et al*, 2023).

La maduración del ARN no es el único proceso al que esta macromolécula está sujeto, por ejemplo, en lugar de generarse un ARN funcional, también puede dirigirse hacia su supresión e incluso su destrucción. Tal es el caso del silenciamiento genético mediante ARN de interferencia (ARNi), en el que un ARN dirige la degradación del ARN mensajero (ARNm), limitando su expresión. En plantas, el silenciamiento genético del ARN es fundamental para el desarrollo, la respuesta a estrés, el mantenimiento y la regulación de la expresión del genoma, la respuesta a estrés biótico y abiótico tal como las infecciones virales (Marquardt *et al*, 2023).

Los avances biotecnológicos han permitido aprovechar mecanismos de procesamiento de ARN que ocurren en los seres vivos de manera natural para extrapolarlos a otros sitios donde normalmente no actuarían sin la intervención humana. Tal es el caso de las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, por sus siglas en inglés) asociadas a nucleasas tipo Cas. El sistema CRISPR-Cas representa un sistema inmunológico adaptativo que se encuentra conservado en bacterias y arqueas, permitiéndoles defenderse del ataque de virus y plásmidos externos, mediante la degradación del material genético extraño y que hoy en día es utilizado para diversos fines como la edición genética, la supresión de la expresión y la detección de patógenos (Huang *et al.*, 2022).

Las secuencias CRISPR fueron descritas por primera vez a finales de la década de los 1980's en *Escherichia coli*, un grupo japonés observó al final de un gen de esta bacteria secuencias de ADN repetidas de 29 pares de bases; de igual forma observaron que entre cada una de estas secuencias repetidas se encontraban secuencias de 32 pares de bases que eran distintas

entre sí. Mas tarde, en el año 2000, en España, se descubrió que este tipo de organizaciones estaban conservadas en muchas especies de bacterias y arqueas, fue aquí donde este agrupamiento se nombró como “repeticiones palindrómicas cortas agrupadas, regularmente espaciadas”, en inglés “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”. En 2002, se descubrió que CRISPR se transcribe y que se encuentra asociado a otros genes que se expresan de igual manera, denominados “genes asociados a CRISPR” o “CRISPR associated (Cas) genes”, que codifican para proteínas con actividad de endonucleasa, formando el sistema CRIPR-Cas (Zurita, 2021).

El sistema CRISPR-Cas9 para el procesamiento de ADN es el más conocido, sin embargo, no es el único, ya que existen varios tipos de proteínas Cas, como Cas13 que va dirigida al procesamiento de ARN, por lo que el sistema CRISPR-Cas13 constituye una potencial herramienta de regulación postranscripcional (Soria, 2022). El sistema CRISPR-Cas13 se ha utilizado para editar el transcriptoma tanto en mamíferos como en plantas, además este sistema representa una herramienta prometedora para combatir la infección por virus de ARN monocatenario (Mahas *et al.*, 2019).

En este trabajo, se desarrolló una plataforma inespecífica con el sistema CRISPR-Cas13 para el procesamiento de ARN en plantas, mediante el ensamblaje de los distintos elementos que conforman el sistema en un plásmido de expresión en plantas. Además, se demostró que la planta modelo utilizada, es capaz de expresar el sistema construido.

MÁRCO TEÓRICO

Sistema CRISPR-Cas

El sistema CRISPR-Cas es un mecanismo de defensa conservado en bacterias y arqueas, similar al sistema de silenciamiento genético mediante ARN de interferencia presente en eucariotas, que permite defender a los organismos de ácidos nucleicos extraños, en general, se compone de dos elementos principales, un ARN que proviene de la secuencia CRISPR, conocido como ARNcr y una endonucleasa Cas (Lammoglia-Cobo *et al.*, 2016).

El descubrimiento del sistema CRISPR-Cas se remota a 1987 cuando Ishino y colaboradores se encontraban estudiando al gen *iap* en *E. coli* K12, reportaron que cerca del gen que estudiaban se encontraban secuencias cortas repetidas de 29 pares de bases interespaciadas por otras secuencias distintas entre sí de 32 pares de bases, sin embargo, en ese momento no se denotó su importancia biológica; más tarde, en 1991, estas secuencias fueron reportadas de igual manera en *Micobacterium tuberculosis*, dos años después, en 1993 Mojica y colaboradores reportaron la presencia de estas secuencias en arqueas, *Haloferax mediterranei*, específicamente. En el año 2000, Mojica y colaboradores, evidenciaron que estas secuencias repetidas interespaciadas, se encontraban presentes en más del 40 % de las bacterias conocidas y en más del 90% de las arqueas. En 2002, se descubrió que existían genes asociados adyacentes a estas secuencias extrañas (Cas), específicamente Cas 1 a Cas 4. Nuevamente Mojica y colaboradores descubrieron, en 2005, que las secuencias espaciadoras coincidían con fragmentos del genoma de virus bacteriófagos. En este mismo año, Bolotín y colaboradores reportaron genes codificadores de Cas distintos a los reportados anteriormente, genes que codificaban para una proteína de mayor tamaño y que podría tener actividad nucleas, esta proteína fue denominada Cas9, al mismo tiempo, revelaron que en los extremos de los espaciadores se encontraba una secuencia que se repetía, lo que hoy se conoce como motivo adyacente a protoespaciador (PAM). Fue hasta 2007 que Barrangou y colaboradores evaluaron la respuesta de *Streptococcus thermophilus* ante el ataque de fagos, y observaron que esta bacteria incorporaba nuevos espaciadores a su locus CRISPR complementarias a secciones del genoma invasor, sirviendo como memoria para futuros

ataques de secuencias homólogas a este genoma, de este modo, se estableció al sistema CRISPR-Cas como un sistema de inmunidad adaptativo.

El funcionamiento de este novedoso sistema de defensa se centra en pequeñas secuencias de ARN que detectan de manera específica la presencia de material genético externo. El proceso inmunitario guiado por CRISPR-Cas ocurre en tres fases, la primera es la adaptación, en la que las bacterias o arqueas que presentan uno o más locus CRISPR responden ante la interacción con ácidos nucleicos extraños, ya sea provenientes de virus o plásmidos, introduciendo fragmentos cortos de este material extraño a sus cromosomas en el extremo proximal del arreglo CRISPR, como puede apreciarse en la figura 1 (Rivero- Maidana *et al.*, 2020).

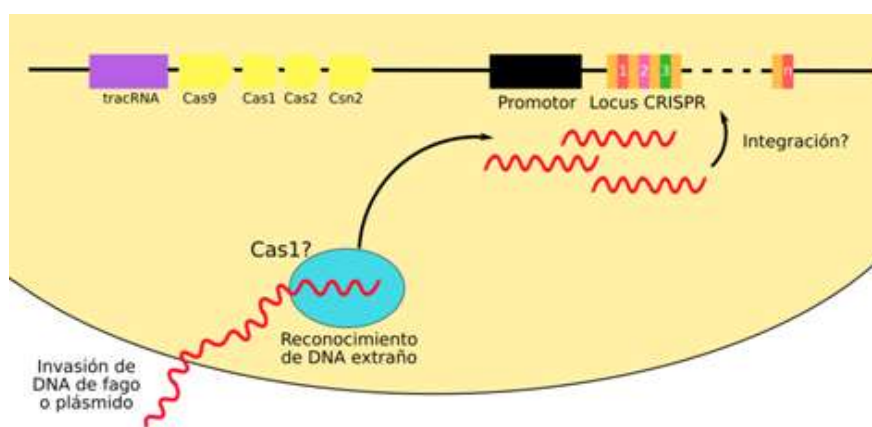


Figura 1. Adaptación bacteriana a través del sistema CRISPR-Cas (tomado de Rivero-Maidana *et al.*, 2020).

La segunda fase, corresponde a la fase de expresión en la que CRISPR se transcribe, dando origen al ARN precursor de CRISPR (pre-crARN), posteriormente, el crARN es cortado enzimáticamente para dar origen a secuencias cortas de ARN denominadas CRISPR ARN (crARN), que se componen de una secuencia palindrómica complementaria en conformación secundaria tipo horquilla, y la secuencia protoespaciadora, que es complementaria a una región del genoma invasor (Navarro *et al.*, 2024).

La tercera fase, es la de inhibición, los crARN maduros forman complejos efectores con las proteínas Cas y dirigen la degradación del material genético como se muestra en la figura 2 (Riveros-Maidana *et al.*, 2020).

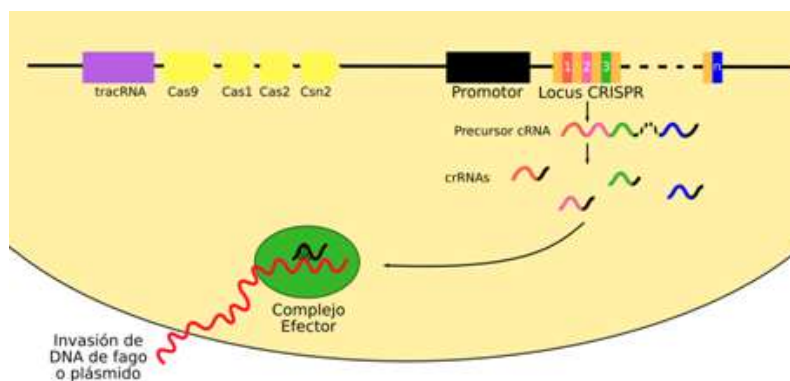


Figura 2. Expresión e inhibición por el sistema CRISPR-Cas (tomado de Rivero- Maidana *et al.*, 2020).

Tipos de sistemas CRISPR-Cas conocidos

El sistema CRISPR-Cas es complejo y constan de diversos componentes que dificultan su clasificación, sin embargo, se ha definido una clasificación politética con criterios filogenéticos tomando en cuenta a Cas 1, que es la proteína más conservada en este sistema complejo (Navarro *et al.*, 2024).

Los primeros sistemas de clasificación se basaron en la comparación de subconjuntos de genes *cas*. Makarova y colaboradores, en 2011, propusieron una clasificación que agrupa a los sistemas CRISPR-Cas en distintos módulos funcionales, aunque superpuestos, tomando en cuenta las funciones que desempeñan las proteínas Cas así como las relaciones evolutivas de los genes *cas*. El primer módulo es el de adaptación, que contiene el gen que codifica a la enzima encargada de integrar un nuevo espaciador, esta enzima es la integrasa Cas1, conservada en la gran mayoría de los sistemas CRISPR-Cas (figura 3), de igual forma se encuentra presente en este módulo la subunidad estructural del complejo de adaptación que es la proteína Cas2 y en algunos casos, se encuentra presente la nucleasa Cas4 y una transcriptasa inversa (RT) no asociada a CRISPR; cabe destacar, que la composición proteica de este módulo es similar en todos los sistemas CRISPR-Cas. El segundo módulo es el de procesamiento de expresión, encargado del procesamiento de pre-crRNA una vez que se sintetiza el RNA. El tercero, el módulo de interferencia o efector, es el encargado del procesamiento de la secuencia objetivo. Por último, el cuarto módulo, es el de transducción de señales o auxiliar, que comprende un grupo de genes cuya función aún es difusa.

Con base en los cuatro módulos efectores, la misma Makarova y sus colaboradores en 2020, propusieron la clasificación más reciente de los sistemas CRISPR-Cas y comprende dos clases, clase 1 y clase 2; 6 tipos, nombrados de I al VI y 30 subtipos (Equerrá, 2022; Makarova *et al.*, 2011).

Sistema CRISPR-Cas clase 1

Dentro de los sistemas CRISPR-Cas de clase 1 encontramos a los sistemas de tipo I, III y IV. Como ya se ha mencionado anteriormente, la composición de los módulos funcionales, son un criterio fundamental para la clasificación de CRISPR-Cas. En los sistemas CRISPR-Cas de clase 1, la proteína Cas6 es la principal encargada del módulo de procesamiento, por otro lado, el módulo efector, consta de distintas proteínas Cas, como lo son, Cas3 (que en algunas ocasiones puede encontrarse fusionada con Cas2), Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas10 y Cas11. Por su parte, el módulo de adaptación es estructuralmente similar en los sistemas de clase 1 y clase 2, en este módulo, la integrasa Cas 1 es clave en la inserción de un nuevo espaciador, además es la proteína Cas más conservada en los sistemas (Makarova *et al.*, 2011).

Otra característica importante de los sistemas de clase 1, es que el complejo efector se encuentra formado por un conjunto de distintas proteínas Cas, conocido como Cascade, por sus siglas en inglés (CRISPR-associated for antiviral defense) y es estructuralmente similar en los tres tipos (I, III y IV), sin embargo, las secuencias codificantes de las proteínas Cas del Cascade presentan una divergencia extrema (Makarova *et al.*, 2011).

Sistema CRIPR-Cas clase 2

Los sistemas CRIPR-Cas de clase 2 se caracterizan por ser más simples que los sistemas de clase 1, esta clase se encuentra conformada por los sistemas de tipo II, V y VI. La principal característica de estos sistemas es que poseen una proteína Cas grande y con mutidominios que se encarga de efectuar el módulo de expresión y el módulo efector (García, 2023).

La composición proteica del módulo de adaptación es similar a los sistemas de clase 1, con la presencia de Cas1, Cas2 y Cas4. Como ya se mencionó anteriormente, el módulo

de expresión está conformado por la misma proteína Cas que el módulo efector, por ejemplo, Cas12 para el tipo V y Cas13 para el tipo VI; por su parte, en el sistema de tipo II, que tiene como proteína multidominio a Cas9, se encuentra una ARNasa tipo III que participa en conjunto con Cas9 como parte del módulo de procesamiento de expresión, como puede observarse en la figura 3 (Makarova *et al.*, 2020).

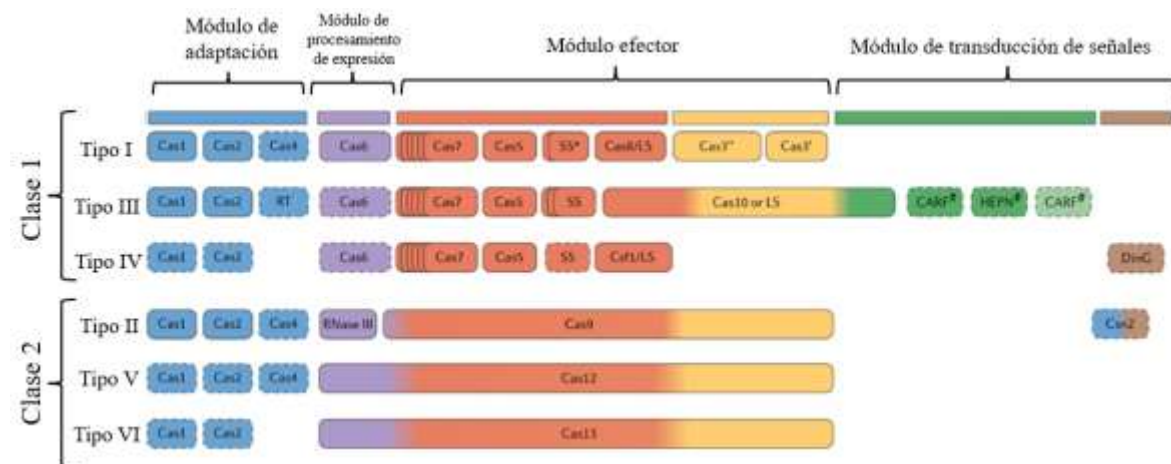


Figura 3. Clasificación de los sistemas CRISPR-Cas en función a la composición proteica de los módulos funcionales (modificado de Makarova *et al.*, 2020).

Sistema CRISPR-Cas13

El sistema CRISPR-Cas13 corresponde a la clase 2 y el tipo VI de la clasificación de Makarova *et al.*, 2020 (figura 3). Como ya se ha mencionado antes, la principal característica de los sistemas de clase 2 es que poseen una proteína Cas multidominio; para este caso, Cas13, que va dirigida a la degradación de ARN, contiene dos dominios de unión a nucleótidos de eucariotas superiores y procariotas (HENP), que forman un sitio catalítico capaz de degradar el ARN una vez que el ARN guía (crARN) se encuentra apareado con un ARN diana (Bot *et al.*, 2022).

Se han descrito varios subtipos de este sistema que contienen distintas proteínas Cas13, que son:

Cas13a

También conocida como C2C2, es una ARNasa guiada por ARN que contiene dos dominios HENP conservados. Consta de dos lóbulos, el lóbulo de reconocimiento de crARN (REC) y el lóbulo de nucleasa (NUC). El lóbulo REC está constituido por el dominio Helical-1 y el dominio N-terminal (NTD), mientras que el lóbulo NUC consta del dominio HENP1, el HENP2, el dominio Helical-2, además de un enlazador entre los dominios HENP (figura 4 a) (Zaho *et al.*, 2022).

Cas13a posee dos actividades de ARNasa distintas, una que se encarga del procesamiento del pre-crARN y otra para la degradación del ARN diana y la degradación colateral de ARN no específico. El crARN maduro consta de un espaciador 3' y un asa 5', que consta de un flanco 5', un tallo 5', un bucle, un tallo 3' y un flanco 3' (figura 4 b) (Zaho *et al.*, 2022).

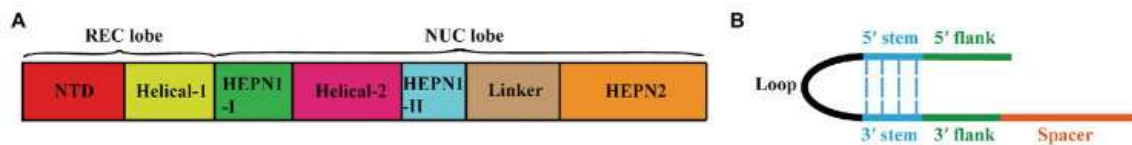


Figura 4. A. Dominios de la nucleasa Cas13a. B. Estructura de crARN maduro (tomado de Zaho *et al.*, 2022).

Cas13b

Al igual que Cas13a, Cas13b contiene dos dominios HENP conservados y una estructura bilobulada que se encuentra compuesta por 5 dominios, que son los dominios HENP 1, HENP 2, Helical-1, Helical-2 y el dominio Lid que recubre el extremo 3' con dos horquillas beta, además de un enlazador de dominios HENP. La actividad ARNasa de Cas13b es de igual forma guiada por un crARN que se posiciona entre los dominios Helical-1, Helical-2 y Lid, mientras que el espaciador sobresale de un canal central grande que atraviesa el centro de la molécula (Slaymaker *et al.*, 2019).

A diferencia de las otras proteínas Cas13, Cas13b presenta sus dominios HENP en los extremos C y N terminales, lo que le confiere una conformación tridimensional distinta, además el crARN se encuentra en posición 3' y el espaciador en 5, que es una posición inversa en comparación con los demás sistemas Cas13 (Slaymaker *et al.*, 2019).



Figura 5. Representación gráfica de los dominios que conforman a Cas13b, teniendo como principal característica la presencia de los dominios HENP en los extremos N y C terminal.

Cas13c

Conocida también como C2C7, es una proteína Cas poco estudiada. Se sabe que cuenta con los dominios HENP característicos de las proteínas Cas13, sin embargo, no hay suficientes datos estructurales y funcionales para determinar su actividad (Shmakoy *et al.*, 2017; Lui y Pei, 2022).

Cas13d

Es la proteína más pequeña de todas las proteínas Cas13, presenta una arquitectura bilobulada (lóbulos NUC y REC) conformada por los dominios NTD, HEPN1, HEPN2, Helical-2, además de dos dominios que no se encuentran presentes en las demás proteínas Cas13 que son el dominio de unión a ADN hélice-giro-hélice (HTH) y el dominio de unión a ADN cinta-hélice-hélice (RHH) (Yan *et al.*, 2018).

El sistema CRISPR-Cas13d además utiliza una proteína accesoria denominada WYL, que aumenta considerablemente la actividad ARNasa de Cas13d. Diversas investigaciones muestran que WYL tiene interacciones débiles con Cas13d, sin embargo la presencia del crARN favorece la unión de Cas13d con WYL, así como su actividad dirigida y colateral en la degradación del ARN monocatenario (ssARN) diana y ssARN circundante, por lo que la proteína accesoria WYL cumple una función de ancla independiente de la secuencia del ssARN, capturando distintos ARNs para presentarlos antes el sistema CRISPR-Cas13d y pueda ejecutarse su procesamiento (Zhang *et al.*, 2019).

Estructura del ARNcr utilizado por el sistema CRISPR-Cas13

Como en todos los sistemas CRISPR-Cas, el ARNcr de CRISPR-Cas13 se expresa en un único pre-ARNcr que posteriormente es procesado para convertirse en un ARNcr maduro, conformado por una repetición directa y un espaciador. La estructura general de

ARNcr maduro, consta de dos partes, una horquilla en forma de asa conformada por la secuencia repetida y una secuencia guía adyacente conformada por el espaciador que puede encontrarse en posición 3' ó 5'.

La arquitectura del ARNcr utilizado por Cas13 consta de un tallo de 5-6 pb, una región de bucle de 7-9 pb sobre ubicada sobre la región del tallo, una región monocatenaria 5' de 8-12 nucleótidos, importante para el reconocimiento del ARNcr por Cas13 y el espaciador ubicado en 3'. El ARNcr de Cas13b presenta un tallo más largo, de 9 a 14 pb con protuberancias y un bucle más pequeño (3-6 nucleótidos), además el espaciador se encuentra en posición 5', inverso a los demás ARNcr de Cas13. Por su parte, la estructura del ARNcr de Cas13c no ha sido dilucidada por completo, se sabe que es más pequeño (30 pb), se conforma por un tallo de 9 pb, un bucle de 4-5 pb y el espaciador se encuentra en posición 3'. Por último, el ARNcr de Cas13d consta de un tallo de 8-10 pb, un bucle de 4-6 pb y el espaciador en posición 3' (figura 5) (O'Connell, 2019).

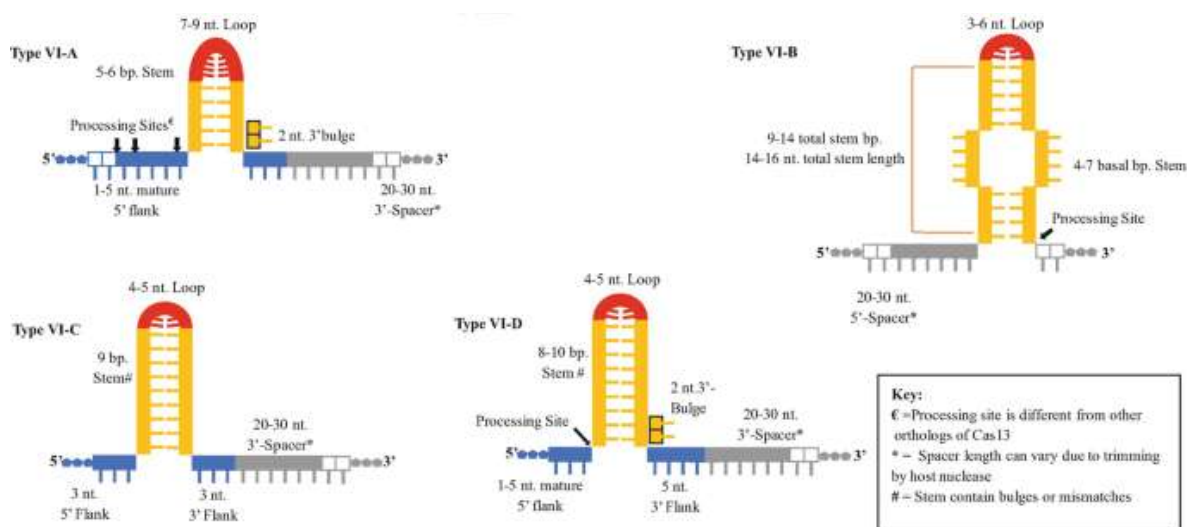


Figura 6. Estructuras del ARNcr utilizadas por los diferentes tipos de Cas13 (tomado de Ashraf *et al.*, 2022).

Mecanismo de acción de CRISPR-Cas13

El sistema CRISPR-Cas13 está compuesto por una nucleasa de ARN programable (Cas13) y un ARNcr de aproximadamente 64-66 nucleótidos, que es capaz de guiar a Cas13 hacia la degradación de un ARN diana mediante la identificación de una secuencia de 20 a

30 nucleótidos del ARN objetivo a través del sitio flanqueante del protoespaciador (PFS) (Lotfi y Razaei, 2020).

La secuencia CRISPR se transcribe en un único pre-ARNcr largo, que es procesado en cadenas más cortas de ARNcr maduros por la proteína Cas13. Una vez formado el complejo ARNcr-Cas13, este mismo escanea el ARN de cadena sencilla invasor, en busca del protoespaciador. La complementariedad entre el ARNcr y la secuencia del protoespaciador, así como la presencia de la secuencia PFS induce cambios conformacionales en Cas13, lo que resulta en la activación de los dominios nucleótidos HEPN y su desplazamiento a la superficie de la proteína, dando lugar a la degradación de ARN invasor (figura 7) (Burimistrz *et al.*, 2020).

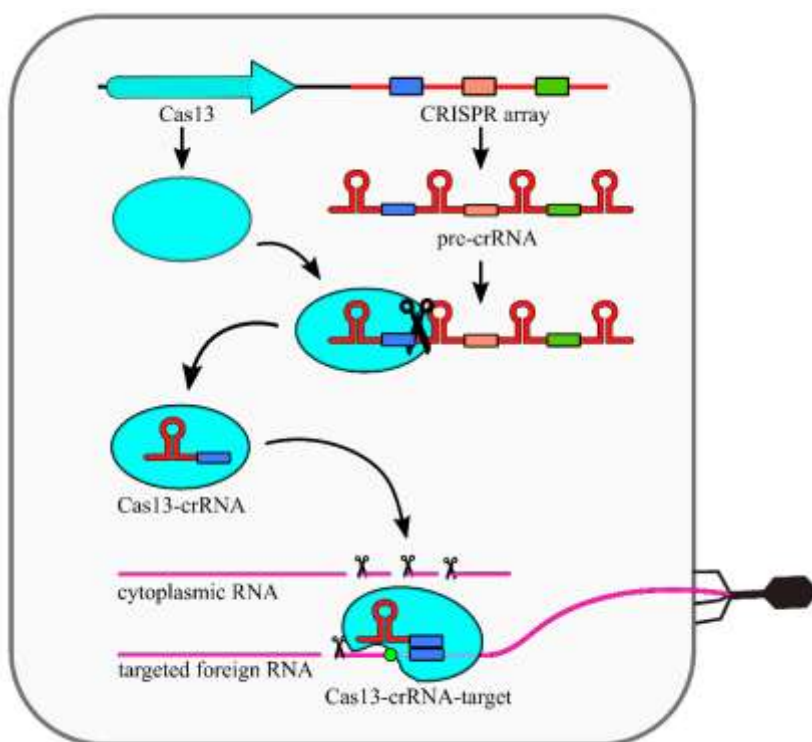


Figura 7. Mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas13 (tomado de Burimistrz *et al.*, 2020).

Procesamiento de ARN mediante CRISPR-Cas13

La revolución genómica dada a raíz de la secuenciación del genoma humano dio paso a investigaciones que buscaban la modificación del ARN para estudiar sus consecuencias

funcionales, durante décadas se han desarrollado diferentes técnicas que permiten procesar al ARN (Grosjean, 2015), ejemplo de ello, es el sistema CRISPR-Cas13.

El sistema CRISPR-Cas13 puede dirigirse a cualquier ARN monocatenario y procesarlo sin ser necesaria una modificación directa sobre el ADN, debido a esto, se ha dirigido el sistema hacia ARN endógeno, propio de diversos organismos. Por ejemplo, se ha utilizado a Cas13 para silenciar de manera eficiente el ARNm de células cancerosas, de igual forma, se ha demostrado el funcionamiento positivo del sistema para la degradación de ARN's no codificantes, como el ARN circular (ARNcirc) y el ARN no codificante largo (ARNlnc) en diversos tipos de cáncer humano (Kavuri *et al.*, 2022).

En plantas, se ha suprimido con éxito el ARNm de distintos genes relevantes, como lo es el ARNm codificante de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una enzima clave en la vía del shikimato, esencial para la síntesis de diversos compuestos aromáticos, además de ser el principal blanco de herbicidas a base de glifosfato (Abudayyeh *et al.*, 2017).

La edición del ARN posterior a la transcripción también es posible mediante CRISPR-Cas13. Cox y colaboradores, en 2017, fusionaron la enzima adenosina desaminasa humana (ADAR), que media la edición endógena del ARNm mediante la desaminación hidrolítica de la adenosina, convirtiéndola en inosina, que es funcionalmente equivalente a la guanosina en la traducción y el empalme, con Cas13b catalíticamente inactiva, utilizando un ARNg de Cas13, lograron dirigir el cambio de adenosina a inosina, en zonas específicas del ARNm, en células HEK293FT. Este método de edición de ARN es ahora conocido como Reemplazo Programable de Adenosina a Inosina (REPAIR).

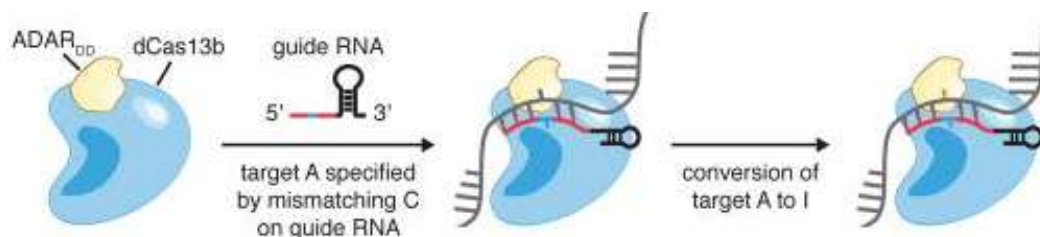


Figura 8. Esquematización de la dirección de la edición del ARN mediante la enzima ADAR y el sistema CRISPR-Cas13 (tomado de Cox *et al.*, 2017).

Como sabemos, el ARN debe procesarse antes de ser ARNm maduro y funcional; una de las principales modificaciones que sufre el ARN es el corte y empalme, en el que son eliminados intrones de la cadena de ARN hetero nuclear (ARNhn), que es el producto inmediato de la transcripción y precursor del ARNm. El empalme alternativo es un fenómeno que ocurre cuando el ARNhn se reestructura y puede dar distintos ARN's mensajeros maduros, este proceso está mediado por la interacción de elementos en cis sobre el ARNhn con factores de empalme que actúan en trans que pueden determinar la inclusión o exclusión de exones (Wang *et al.*, 2015).

Konerman y colaboradores, en 2018, demostraron que la unión de Cas13 catalíticamente inactiva a uno de estos factores de empalme es suficiente para la obtención de isoformas proteicas a partir de la alteración dirigida del empalme alternativo. Para ello, identificaron elementos de empalme en un reportero de empalme con dos proteínas fluorescentes, la DsRed, que se encuentra aguas arriba (upstream) de la segunda proteína, mTagBFP2, presentes en marcos de lectura distintos después de un exón empalmado alternativamente. La inclusión o eliminación de este exón cambia el marco de lectura, así como la fluorescencia resultante. Para lograr la intervención en el proceso de empalme, se fusionó a Cas13 catalíticamente inactiva con la ribonucleoproteína nuclear heterogénea altamente conservada 1 (hnRNP1), que inhibe la inclusión de exones a través de un dominio C-terminal rico en glicina. Se utilizó la matriz CRISPR para diseñar ARN's guías y dirigirlos en conjunto a zonas clave del exón, que participan en el proceso de empalme. CRISPR Cas13 fusionado con hnRNP1 logró la exclusión efectiva de un exón específico, demostrando que el sistema CRISPR-Cas13 es útil para dirigir el empalme alternativo (Konermann *et al.*, 2018).

De igual forma, CRISPR-Cas13 puede ser utilizado para la detección de ácidos nucleicos, que es de gran utilidad para el diagnóstico y seguimiento eficiente de enfermedades tanto en animales como en plantas. Los métodos de detección de ácidos nucleicos actuales como lo son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), presentan diversas limitantes, como la inhibición por sustratos no aptos. Gootenberg y colaboradores en 2017, desarrollaron una plataforma de detección de ácidos nucleicos denominada Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing (SHERLOCK), que utiliza la actividad de degradación colateral de ARN de Cas13a para detectar la presencia de ARN

específico, por ARN's guías, *in vivo*, mediante la muerte celular programada, e *in vitro*, mediante la degradación colateral de ARN reportero. Además, SHERLOCK es altamente sensible, siendo capaz de reconocer ácidos nucleicos con la presencia de una sola molécula, al igual que altamente específica, discriminando un solo nucleótido entre moléculas (Abudayyeh *et al.*, 2019).

Abudayyeh y colaboradores en 2019, utilizaron con éxito a SHERLOCK para la detección de múltiples genes de interés en cultivos de soja, de igual forma, mostraron que el sustrato necesario, no requiere de procesamiento especial, en comparación con otras técnicas moleculares de detección de genes, lo que simboliza un ahorro en costo, tiempo y aspectos técnicos sin perder precisión y sensibilidad. SHERLOCK, puede ser usado en otros contextos agrícolas como la detección temprana de fitopatógenos, como virus, de manera rápida, lo que permite tomar acciones pertinentes para evitar pérdidas en cultivos (Abudayyeh *et al.*, 2019).

Antecedentes del uso de CRISPR-Cas13 en el control de enfermedades virales en plantas

Los virus son parásitos intracelulares obligados que requieren la maquinaria celular de sus huéspedes para poder causar daño, los virus fitopatógenos son de gran relevancia debido a que pueden causar grandes pérdidas de cultivos, y económicas, a nivel mundial.

Debido a que las infecciones virales en plantas son de gran importancia, es necesario desarrollar tratamientos cada vez más eficientes que permitan a las plantas hacer frente a patógenos. Zhan y colaboradores en 2023, desarrollaron plantas transgénicas de papa (*Solanum tuberosum* L.) resistentes al virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV), el virus de la papa Y (PVY), el virus de la papa X (PVX) y el virus de la papa S (PVS), utilizando el sistema CRISPR-Cas13 con un ARN guía policistrónico para atacar simultáneamente a los cuatro virus en un solo individuo.

Para desarrollar la plataforma denominada CRISPR-Cas13d/PTG multiplex (Zhan *et al.*, 2023) se construyó un vector binario (pPTG) con un gen sintético para Cas13d y un gen policistrónico ARNt-ARNg (PTG) para la producción de cuatro gARN's dirigidos a los genes de cápside de los cuatro virus de interés PLRV, PVY, PVS y PVX. La expresión de ambos genes es favorecida por el promotor *UBQ10* para *Cas13d* y *AtU6* para PTG (figura 9).

Una vez obtenido el constructo, se introdujo a plantas de papa mediante *Agrobacterium* y se seleccionaron líneas transgénicas. La expresión de Cas13d se midió mediante transferencia Western y la presencia de los cuatro ARN's guía se evidenció mediante qRT-PCR. Para demostrar la resistencia a virus por parte de las plantas con el sistema Cas13d/PTG, se infectaron las plantas transgénicas, primero con un solo virus y la concentración viral se evaluó a los 15 y 25 días post inoculación mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA) y qRT-PCR. Se demostró que las plantas que contenía el sistema CRISPR-Cas13/PTG inhibieron fuertemente la acumulación de los cuatro virus probados individualmente. Para evaluar la multirresistencia viral, se infectaron plantas transgénicas que expresaban CRISPR-Cas13d/PTG con los virus PVY y PVX, las cuales mostraron una reducción en la acumulación de ambos virus. Para reforzar esta evidencia, se infectaron plantas de papa resistentes a PVY, con ambos virus (PVY y PVX), las cuales solo mostraron reducción en la concentración y sintomatología de PVY. Lo anterior, demuestra que CRISPR-Cas13d/PTG tiene un amplio potencial para degradar múltiples genomas virales de manera simultánea.

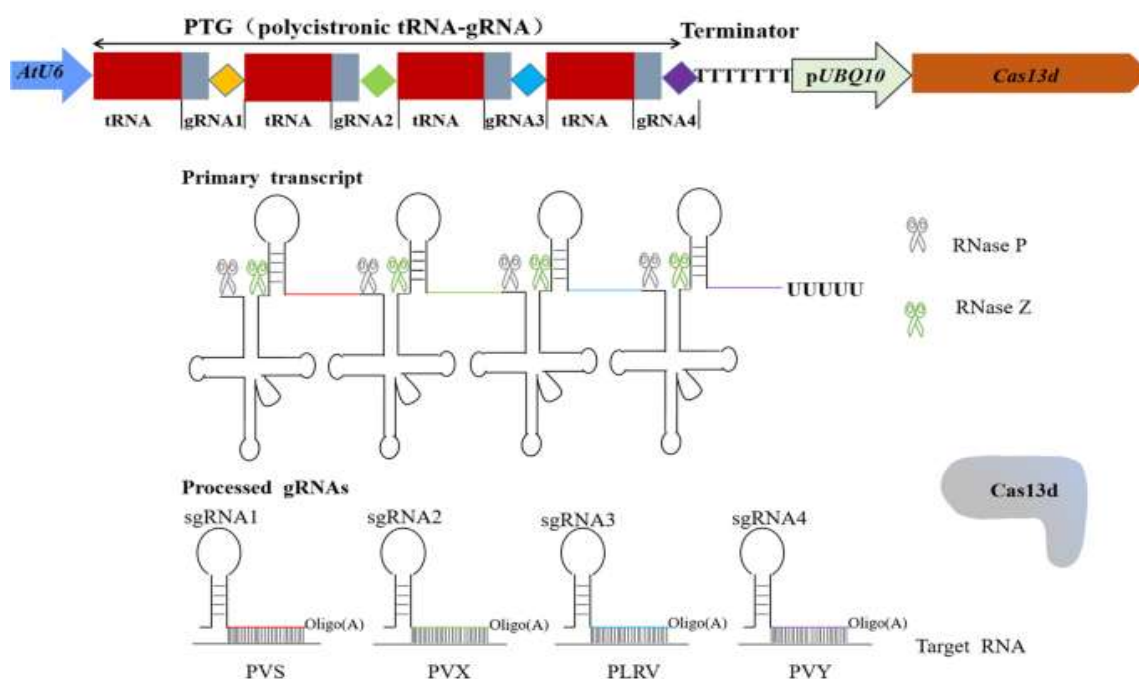


Figura 9. Arquitectura del sistema CRISPR-Cas13d/PTG multiplex (tomado de Zhan *et al.*, 2023).

Ventajas y limitantes del uso de CRISPR-Cas13 ante otros sistemas CRISPR-Cas

Los sistemas CRISPR-Cas se han posicionado como una de las herramientas moleculares más novedosas de la actualidad. Gran parte de las proteínas Cas conocidas hasta el momento tiene como diana al ADN, sin embargo, la edición de ADN con CRISPR presenta ciertas limitaciones como la necesidad de un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) en la diana, mutaciones inespecíficas y baja eficiencia en contra virus. Por su parte, el procesamiento de ARN mediante CRISPR-Cas13 es ventajoso sobre la edición del ADN, ya que disminuye el riesgo de efectos pleiotrópicos no deseados, además de que los productos, así como la modificación del ARN pueden ser regulados con mayor facilidad, de manera precisa y espaciotemporal (Kavuri *et al.*, 2022).

Por otro lado, CRISPR-Cas13 presenta limitantes. Aunque se ha mencionado que la actividad de degradación colateral de ARN por Cas13 puede ser aprovechada, hacen falta estudios para determinar los posibles efectos negativos de dicha actividad.

ARN de interferencia (ARNi): otra tecnología para el procesamiento de ARN

El ARN de interferencia es un mecanismo de silenciamiento genético ampliamente distribuido en eucariotas. El silenciamiento de genes se da por la interacción de un complejo de proteínas en el citoplasma denominado RISC (Complejo de Silenciamiento Mediado por ARN), por sus siglas en inglés, con pequeñas moléculas de ARN (ARNsi), las cuales actúan sobre el ARNm impidiendo que este se traduzca a proteína (Noriega *et al.*, 2016).

Este mecanismo está mediado por ARN's de doble cadena (ARNdc), de 21 a 223 pares de bases, que pueden ser introducidas a las células de manera artificial, mediante una infección viral o sintetizadas intracelularmente. Una vez presente el ARNdc, es fragmentado en moléculas más pequeñas (ARNsi) por medio de la enzima Dicer, perteneciente a la familia de las ARNasas tipo III. Los ARNsi producidos activan al complejo RISC, que, entre otros componentes, se encuentran las proteínas argonautas Ago1 y Ago2. RISC, elimina la cadena sentido de los ARNsi dejando únicamente a la cadena antisentido como guía del complejo efector. Una vez unido el complejo al ARNm objetivo, RISC degrada al ARNm mediante motivos catalíticos ARNasa tipo II, produciendo el silenciamiento genético (Noriega *et al.*, 2016; Correa *et al.*, 2008).

La interferencia mediante ARN se ha convertido en una herramienta muy importante para el control de la expresión genética, y ha sido fundamental para comprender los efectos de la expresión genética en plantas, principalmente ante la respuesta ante el estrés biótico y abiótico, de igual forma se ha utilizado como una alternativa para el control de fitopatógenos como los virus, que pueden causar enfermedades importantes en cultivos de todo el mundo (Koepppe, 2023).

Aspectos bioéticos sobre el uso de CRISPR-Cas y el procesamiento de ARN

Aunque los sistemas CRISPR-Cas se han posicionado como mecanismos de edición genética eficientes y muy prometedores, aún existen preocupaciones en aspectos de bioseguridad y daño al equilibrio ambiental. A pesar de que estos sistemas potencializan la obtención de cultivos mejorados, así como la resolución de problemas agrícolas de gran impacto, como las enfermedades por fitopatógenos, al liberarlos al medio ambiente, existen un sinnúmero de posibilidades y consecuencias no previstas, como la alteración de ecosistemas, el desplazamiento de especies silvestres, daño en el flujo de genes, generar resistencia por parte de patógenos, así como otras plantas parásitas, por lo que es necesario continuar con el desarrollo de investigaciones que busquen dilucidar por completo las consecuencias, buenas y malas, de la aplicación de CRISPR-Cas fuera del laboratorio. De igual forma, es necesaria la implementación de leyes y políticas gubernamentales que busque la regulación y aplicación de CRISPR-Cas de manera justa en la sociedad, evitando la incidencia en lagunas legales para garantizar que los avances científicos se encaminen hacia el desarrollo de una sociedad moderna y no para el beneficio de unos pocos (Elizondo-Luevano *et al.*, 2024).

JUSTIFICACIÓN

Se han diseñado distintas técnicas y tratamientos contra virus fitopatógenos, así como para procesar ARN propio de la planta, como la tecnología de ARN de interferencia (ARNi). Sin embargo, la alta tasa de mutación en los virus y la necesidad de nuevos modelos vegetales para la investigación puede superar el control por estas técnicas, por lo que es necesario desarrollar nuevos métodos, más rápidos, versátiles, de fácil ejecución y bajo costo, para poder hacer frente a las infecciones masivas por virus (Zhan *et al.*, 2023) y a las necesidades en investigación vegetal. El sistema CRISPR-Cas13 representa una herramienta novedosa que permite el procesamiento de ARN foráneo y propio de las plantas, se ha demostrado su efectividad en plantas como soja y papa (Abudayyeh *et al.*, 2019; Zhan *et al.*, 2023). Sin embargo, los trabajos realizados en la actualidad se centran en la obtención de plataformas específicas que tiene cobertura para un único ARN o para un grupo limitado de estos. La construcción de sistemas desde cero para procesar nuevas dianas moleculares resulta un proceso tardado y costoso, por lo que es necesario diseñar una plataforma de alta versatilidad que permita disminuir tiempo y costos, mientras hace frente a las necesidades planteadas anteriormente.

OBJETIVOS

- **Objetivo general**

- Desarrollar una plataforma con el sistema CRISPR-Cas13 para el procesamiento de ARN en plantas.

- **Objetivos específicos**

- Obtener fragmentos correspondientes al ARNg para Cas13, promotor constitutivo NOS y la secuencia codificante de Cas13.
- Clonar fragmentos de interés en el plásmido de expresión para plantas PHD-m-Cherry.
- Trasformar cepas bacterianas de mantenimiento (*E. coli DH5 α CT*) con el plásmido clonado.
- Transformar plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) con la plataforma construida mediante *Agrobacterium tumefaciens*.
- Comprobar la expresión *in planta* de la plataforma construida.

METODOLOGÍA

Obtención de fragmentos de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los fragmentos de interés se obtuvieron mediante amplificación por PRC utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Thermo Scientific, California, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y ajustando el volumen de reacción a 10 µL, utilizando un termociclador T-100 (BIORAD, USA).

El fragmento ARNg con un tamaño de 209 pb se obtuvo a partir del plásmido pAc-sgRNA-Cas9 con código de Addgene 49330 disponible en el Laboratorio de Cultivos Vegetales del Jardín Botánico Universitario de la BUAP, empleando los oligonucleótidos crBspQFw

CCACgCCAATATCGAAGGcGACTAAAACGGAAGAGCTCGCTCTTCCAGATCTGG
AAAAATGATGTGACAGTGG y crRNARv

gaattcGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGG. Para la obtención del fragmento correspondiente al promotor transcripcional NOS, con un tamaño de 263 pb, se utilizó el plásmido pHDE-35S-Cas9-mCherry con código de Addgene 78931 también disponible en el mismo laboratorio empleando los oligonucleótidos XbaI Fw tctagaCCGATGACGCGGGACA y NOSRv TGCAGATTATTTGGATTGAGAGTG, en ambos casos se emplearon las condiciones de amplificación mostradas en la tabla 1

Tabla 1. Condiciones de PCR para la amplificación de las secuencias ARNg y promotor NOS.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	60 s	Único
Desnaturalización	95 °C	15 s	25
Alineamiento	59 °C	15 s	
Extensión	72 °C	15 s	
Extensión final	72 °C	3 min	Único

El fragmento de DNA codificante de Cas13 de aproximadamente 4163 pb se obtuvo a partir del plásmido pC001 - huLshC2C2-MBP con código de Addgene 79150 y disponible también en el Laboratorio de Cultivos Vegetales, empleando el siguiente par de oligonucleótidos BglC2Fw agatctATGGGCAACCTGTTCGGACAC y XhoSTOPC2Rv ctcgagTCACAGGGTATCGTTAGTATTCTCG, con las condiciones de amplificación mostradas en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación de la secuencia codificante de Cas13.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	Único
Desnaturalización	95 °C	15 s	35
Hibridación	66 °C	15 s	
Extensión	72 °C	4.5 min	
Extensión final	72 °C	5 min	Único

Posterior a la amplificación por PCR, se realizó electroforesis a 90V durante 40 minutos en geles de agarosa al 1% preteñidos para el producto de las reacciones para promotor NOS y el ARNg, y en geles de agarosa al 0.7% para Cas13, ambos preteñidos con bromuro de etidio.

Los fragmentos del tamaño esperado fueron escindidos del gel de agarosa y se purificaron mediante el kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research, California USA), ajustando el volumen final a 30 µL.

Desarrollo del constructo NOS:ARNg

El ensamblaje del constructo NOS:ARNg se realizó mediante ligación enzimática con el kit T4 DNA ligase (Thermo Scientific, California USA), siguiendo las instrucciones del fabricante y ajustando el volumen de reacción a 20 µL, utilizando una proporción 1:1 de los fragmentos purificados.

Posterior a la ligación, se realizó una PCR para amplificar el constructo NOS:ARNg utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion mencionada anteriormente, ajustando

el volumen de reacción a 10 µL, con las condiciones mostradas en la tabla 1 aumentado el tiempo de extensión a 30 s, utilizando los oligonucleótidos XbaI Fw tctagaCCGATGACGCGGGACA y crRNARv gaattcGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGG como se muestra en la figura 10.

El producto de la PCR se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, preteñido con bromuro de etidio, a 90V durante 40 minutos, con el fin de identificar fragmentos de tamaño aproximado de 472 pb correspondientes al constructo NOS:ARNg.

El fragmento del tamaño esperado fue escindido del gel de agarosa y se purificó mediante el kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research, California USA), eluyendo en 30 µL de agua libre de nucleasas.

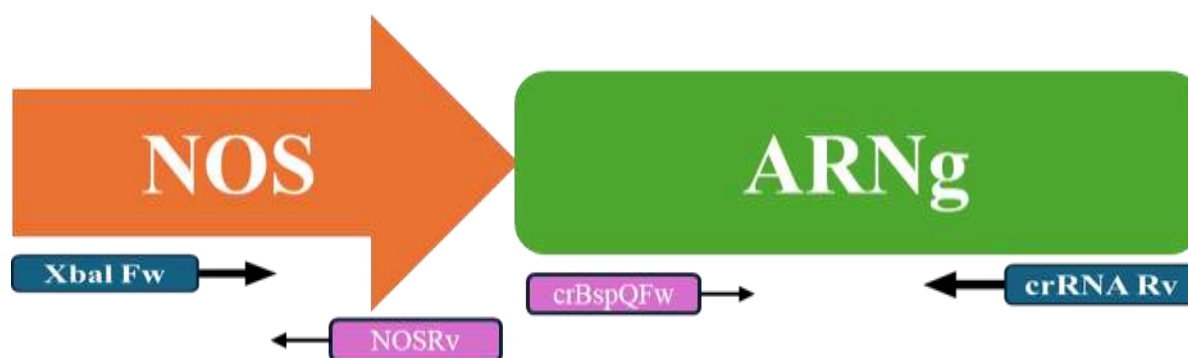


Figura. 10. Representación gráfica del constructo NOS:ARNg y la unión de los oligonucleótidos para su amplificación.

Clonación de los fragmentos de interés en el plásmido de expresión

Clonación de constructo NOS:ARNg

Para el ensamblado de la plataforma molecular de expresión Se utilizó el plásmido pHDE-35S-Cas9-mCherry mencionado anteriormente. Previo a la clonación, el plásmido se sometió a digestión enzimática con la enzima de restricción *MluI* (FastDigest Value Pack Unit, Thermo Scientific, California USA), el producto de digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa 0.7%, teñido con bromuro de etidio, a 94V durante 40 minutos y fue extraído y purificado a partir del gel mediante el kit Zymoclean Gel DNA

Recovery (Zymo Research, California USA), ajustando el volumen final a 30 μ L. Posteriormente se realizó la eliminación de extremos de cadena sencilla del producto purificado, mediante el kit Anza DNA Blunt End (Thermo Scientific, California USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, ajustando el volumen final de reacción a 10 μ L.

Se insertó el constructo NOS:ARNg en el plásmido tratado con Anza DNA Blunt End mediante ligación enzimática con el kit T4 DNA ligase (Thermo Scientific, California USA), siguiendo las instrucciones del fabricante y ajustando el volumen de reacción a 20 μ L, utilizando una proporción 1:1 entre el plásmido tratado y el cosntructo NOS:ARNg purificado.

Clonación de la secuencia codificante de Cas13

Se partió del plásmido PHD-m-Cherry clonado con el constructo NOS:ARNg. Previo a la clonación, el plásmido se sometió a digestión enzimática con la enzima *XhoI* (FastDigest Value Pack Unit, Thermo Scientific, California USA), el producto de digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa 0.7%, teñido con bromuro de etidio, a 94V durante 40 minutos y fue purificado a partir del gel mediante el kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research, California USA), ajustando el volumen final a 30 μ L. De igual forma, se realizó la eliminación de extremos de cadena sencilla del producto recuperado mediante el kit Anza DNA Blunt End (Thermo Scientific, California USA) mencionado anteriormente, ajustando el volumen final a 10 μ L.

Se insertó la secuencia codificante de Cas13, previamente purificada, en el plásmido tratado con Anza DNA Blunt End mediante ligación enzimática con el kit T4 DNA ligase (Thermo Scientific, California USA), siguiendo las instrucciones del fabricante y ajustando el volumen de reacción a 20 μ L, utilizando 4 μ L de plásmido y 3 μ L de la secuencia codificante de Cas13.

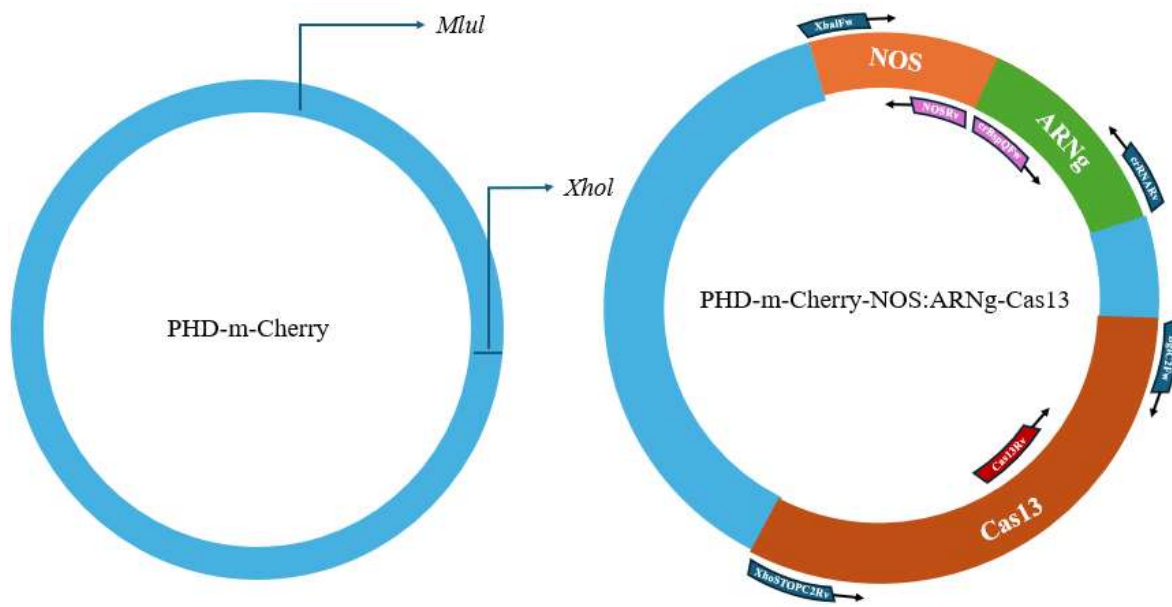


Figura 11. Representación gráfica de los sitios de restricción escindidos para la clonación de los fragmentos de interés y producto final de después de la clonación de los fragmentos de interés en el plásmido de expresión PHD-m-Cherry.

Preparación de células bacterianas competentes

Se inocularon 10 mL medio LB líquido con *E. coli* DH5αCT y se incubaron a 37 °C y 180 rpm por una noche, posteriormente, se inocularon 250 mL de medio LB líquido con 1 mL del cultivo inicial y se incubó a 37°C en agitación hasta conseguir un crecimiento bacteriano con DO600 de entre 0.35 – 0.4, cuando el crecimiento estuvo dentro del rango anterior, el cultivo de células se transfirió rápidamente a hielo durante 20 minutos, agitando ocasionalmente de forma manual. Después, el cultivo se transfirió, en campana de flujo laminar, a 4 tubos Falcon ® estériles de 50 mL y se centrifugó a 4,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante. Cada pastilla se resuspendió cuidadosamente en 10 mL de una solución de MgCl 100 mM frío, posteriormente se juntaron las soluciones bacterianas en dos tubos para ser centrifugadas a 3,000 rpm por 15 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en 50 mL de solución de CaCl₂ a 100 mM y se incubaron en hielo por 20 minutos. Posterior al tiempo de incubación en hielo, las células fueron centrifugadas nuevamente a 3,000 rpm por 15 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y los precipitados bacterianos se resuspendieron 40 mL de una solución de

CaCl₂ 85 mM, glicerol 15%, luego fueron centrifugados a 2100 rpm por 15 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante y las pastillas formadas se resuspendieron en 2 mL de CaCl₂ 85 mM, glicerol 15% v/v, finalmente, se colocaron alícuotas de 200 µL de la suspensión formada en tubos Eppendorf ® estériles de 1.5 mL, previamente enfriados (-20°C) y en escarcha proveniente de ultracongelador a -80°C, los cuales fueron almacenados a -80°C.

Obtención de células competentes de *Agrobacterium*

Para la obtención de *Agrobacterium* se inocularon 10 mL medio YEP líquido, suplementado rifampicina, dejándose incubar durante 20 horas a 28°C 180 rpm. Posteriormente, se inocularon 250 mL de medio YEP enriquecido con rifampicina para *Agrobacterium*, con 1 mL del cultivo inicial y se incubó a 28°C en agitación, hasta conseguir un crecimiento bacteriano con DO₆₀₀ 0.5 – 0.55. Cuando el crecimiento estuvo dentro del rango estipulado, los cultivos de células se transfirieron rápidamente a hielo durante 20 minutos, agitando ocasionalmente de forma manual. Después, cada cultivo se transfirió, en campana de flujo laminar, a 4 tubos cónicos estériles de 50 mL y se centrifugó a 4,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante. Las pastillas resultantes de *Agrobacterium* fueron lavadas con agua estéril fría, centrifugando a 4000 rpm, a 4°C por 15 minutos, desechando el sobrenadante.

Finalmente, las pastillas formadas se resuspendieron en 2 mL de CaCl₂ 85 mM, glicerol 15% v/v y se colocaron alícuotas de 200 µL de la suspensión formada en tubos estériles de 1.5 mL, previamente enfriados (-20°C) y en escarcha proveniente de ultracongelador a -80°C, los cuales fueron almacenados a -80°C.

Transformación bacteriana con el plásmido clonado

Se transformaron células competentes *E. coli DH5aCT* y *Agrobacterium* mediante choque térmico. Los viales que contenían el cultivo celular utilizados para la transformación fueron sacados de su confinamiento a -80°C para ser descongelados en frío, una vez que el contenido del vial con las células competentes se mostró líquido, se agregaron 10µL del plásmido, para *E. coli* y 4 µL para *Agrobacterium*, posteriormente las células se incubaron por 1 y 3 minutos, respectivamente, a 42°C y después, rápidamente fueron colocados en hielo durante 5 minutos, enseguida se añadió, en campana de flujo laminar, 1 mL de medio LB

líquido y se incubaron en agitación por 1 y 2 horas a 37°C y 28°C a 150 rpm, posterior a la incubación, los células fueron sometidos a centrifugación durante 2 minutos a 8,000 rpm, se desecharon tres cuartas partes del sobrenadante y las pastillas formadas fueron resuspendidas en el líquido sobrante. Finalmente, la suspensión bacteriana se sembró en masivo con ayuda de perlas de vidrio, sobre una placa Petri con medio LB sólido, enriquecido con 100 µg/mL de espectinomicina y se incubó a 37°C y 28°C durante una noche.

Pasada la noche de incubación, se seleccionaron colonias candidatas y se resembraron en línea en medio LB sólido enriquecido con espectinomicina y se cultivaron bajo las mismas condiciones de incubación.

Extracción de plásmido a partir de bacterias transformadas

Se tomó una pequeña porción de la resiembra de las colonias seleccionadas que presentaron crecimiento, y con ello se inocularon 3 mL de medio LB líquido enriquecido con espectinomicina en tubos Falcon ® de 50 mL, una vez inoculados, los tubos fueron incubados en agitación a 37°C a 200 rpm por 18 hrs, pasando ese tiempo el medio inoculado se transfirió a tubos Eppendorf ® de 1.5 mL estériles y centrifugaron a 8,000 rpm durante un minuto, la pastilla resultante fue resuspendida en 100 µL de solución TE, posteriormente, se añadieron 100 µL de solución de lisis al tubo (8.8 mL de agua, 0.2 mL de NaOH y 1 mL SDS), se agito por inversión y se incubó durante 4 minutos a temperatura ambiente, después se agregaron 120 µL de solución neutralizante y se incubó en hielo (-20°C) durante 5 minutos, pasado el tiempo de incubación en frío, la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos, se recolectó en un tubo nuevo y estéril, la mayor cantidad de sobrenadante posible, teniendo extremo cuidado de no tomar ninguna fracción de la fase sólida, se agregó un volumen equivalente de isopropanol frío (-20°C) y se incubó a -20°C durante 20 minutos, posteriormente, el tubo se centrifugó a 12,000 rpm durante 8 minutos, se desechó el sobrenadante y la pastilla formada se lavó con 400 µL de etanol al 75% frío y se centrifugó un minuto a 12,000 rpm. Finalmente, la pastilla se secó a temperatura ambiente y se diluyó en 20 µL de agua libre de nucleasas.

Prueba de PCR para identificar fragmentos de interés

Con el fin de verificar el éxito de la clonación de los fragmentos de interés en el plásmido de expresión, se realizaron pruebas de amplificación por PRC utilizando la ADN polimerasa Dream Taq (Thermo Scientific, California, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y ajustando el volumen de reacción a 10 μ L. Las reacciones se realizaron en un termociclador T-100 (BIORAD, USA), utilizando los oligonucleótidos específicos para el constructo NOS:ARNg y la secuencia codificante de Cas13.

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, a 90V durante 40 minutos para la amplificación del constructo NOS:ARNg y al 0.7% durante 40 minutos para la secuencia codificante de Cas13

Se extrajo el plásmido de las clonas bacterianas que presentaron resultados positivos a la prueba de PCR siguiendo el protocolo del kit ZymoPURE Plasmid Miniprep (Zymo Research, California USA) y ajustando el volumen final a 30 μ L.

Prueba de digestión enzimática para verificar la presencia y el sentido de Cas13

Se realizó una digestión enzimática al plásmido PHD-m-Cherry-NOS:ARNg-Cas13 purificado con kit ZymoPURE Plasmid Miniprep con la enzima de restricción *Eco 32I* (FastDigest Value Pack Unit, Thermo Scientific, California USA), para validar la presencia y la inserción en el sentido correcto de la secuencia codificante de Cas13. El producto de digestión fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %, teñido con bromuro de etidio a 94V durante 40 minutos.

La presencia en sentido de la secuencia codificante de Cas13 estaría evidenciada por la presencia de un patrón de bandas de aproximadamente 5,524 pb, 3,609 pb y 11,200 pb, mientras que la inserción en antisentido presentaría un patrón de bandas de aproximadamente 11,200 pb y 4,800 pb. Por otro lado, la ausencia de la secuencia mostraría un patrón de bandas de 3,900 pb y 13,000 pb después de la digestión enzimática.

Verificación de identidad de constructo mediante secuenciación

Para verificar la inserción del constructo NOS:ARNg y de la secuencia codificante de la nucleasa Cas13, se envió a secuenciar una alícuota del plásmido PHD-m-Cherry-NOS:ARNg-Cas13 a secuenciación utilizando los oligonucleótidos mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación.

Oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'	Blanco
BglC2Fw	agatctATGGGCAACCTGTTCGGACAC	Cas13
Cas13Rv	GAAGTTGGTCAGGATCACG	
XbaI Fw	tctagaCCGATGACGCGGGACA	NOS:ARNg
crRNARv	gaattcGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGG	

Transformación de plantas de tabaco (*Nicotina tabacum*) con la plataforma construida mediante agroinfiltración con *Agrobacterium tumefaciens*

Se tomó una pequeña porción de la resiembra de las colonias seleccionadas de *A. tumefaciens* para inocular 6 mL de medio YEM enriquecido con espectinomicina (preinóculo) y se incubó en agitación a 180 rpm a 28°C hasta alcanzar una densidad óptica de entre 0.5 y 1 DO₆₀₀. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, se tomó 1 ml del preinóculo y se inocularon 200 mL de medio YEM enriquecido con espectinomicina y acetosiringona 150 µM, el medio inoculado se incubó a temperatura ambiente (26°C) a 130 rpm durante una noche.

En una campana de flujo laminar, se tomó una alícuota de 50 mL del medio de cultivo con crecimiento y se procedió a la transformación de las plantas de *Nicotina tabacum* (por duplicado y un control negativo) mediante la técnica de agroinfiltración. Para ello, se tomó una cantidad de la alícuota con una jeringa sin aguja de 5 mL, se colocó la parte superior de la jeringa sobre el envés de las hojas haciendo presión en el émbolo de esta, teniendo extremo cuidado de no romper ni dañar las hojas. Después de la transformación, las plantas se incubaron bajo periodos controlados de luz/oscuridad a 26.7 °C.

Obtención de ARN total a partir de plantas de *Nicotina tabacum* transformadas

Se recolectaron fragmentos de hojas de las plantas transformadas y se colocaron en tubos de 1.5 ml para su posterior uso. El ARN total de las muestras vegetales se obtuvo mediante el kit TRIZOL Reagent (Invitrogen, Thermo Scientific, California USA) con las modificaciones sugeridas por Wang, G., y cols. (2012), utilizando 0.15 gramos de tejido vegetal, ajustando el volumen final de la muestra a 20 μ L con agua libre de nucleasas, posteriormente las muestras fueron conservadas a -20°C.

Para evaluar la calidad del ARN extraído, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, a 80V por 45 minutos. De igual forma se midió la concentración del ARN en la muestra usando un nanoespectrofotómetro (IMPLEN, Munich Alemania) considerando una relación de absorbancia 260/280 nm.

Obtención de ADNc a partir de ARN total

Se utilizó el kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Thermo Scientific, California USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, con 0.5 μ L de ARN total extraído de tejido vegetal transformado, 0.5 μ L de una mezcla de RNAnucleótidos comprendido por el oligonucleótido reverso específico para el ARNg, la secuencia codificante de Cas13 y ARN 18s, y ajustando el volumen final a 20 μ L con agua libre de nucleasas.

Amplificación de ARNg y Cas13 a partir de ADNc construido

Con el fin de demostrar la expresión de la plataforma construida en las plantas transformadas, se realizó una reacción de PCR a partir del ADNc construido, utilizando la ADN polimerasa Dream Taq (Thermo Scientific, California, USA) para amplificar al ARNg y la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Thermo Scientific, California, USA) para la secuencia codificante de Cas13, utilizando 1 μ L de ADNc, siguiendo las instrucciones del fabricante y ajustando el volumen de reacción a 10 μ L, utilizando un termociclador T-100 (BIORAD, USA).

Se utilizaron los oligonucleótidos específicos para amplificar al ARNg, para el caso de Cas13, se amplificó una fracción de la secuencia total utilizando los oligonucleótidos específicos para dicha secuencia.

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio a 94V para observar las bandas correspondientes al ARNg, mientras que para el fragmento de la secuencia codificante se utilizó un gel de agarosa al 0.7% con las mismas condiciones.

RESULTADOS

Obtención de fragmentos de interés ARNg y promotor NOS

El promotor NOS comprende una secuencia de 263 pares de bases que fue amplificada por duplicado mediante PCR para su posterior purificación. La electroforesis en gel de agarosa reveló bandas brillantes del tamaño aproximado al esperado, comparado con el marcador de pares de bases, como puede observarse en la figura 12, por lo que se presume que la amplificación del promotor fue exitosa. De igual forma, el ARNg consta de una secuencia de 209 pb, el tamaño de las bandas observadas en la figura 12 concuerda con el tamaño esperado.

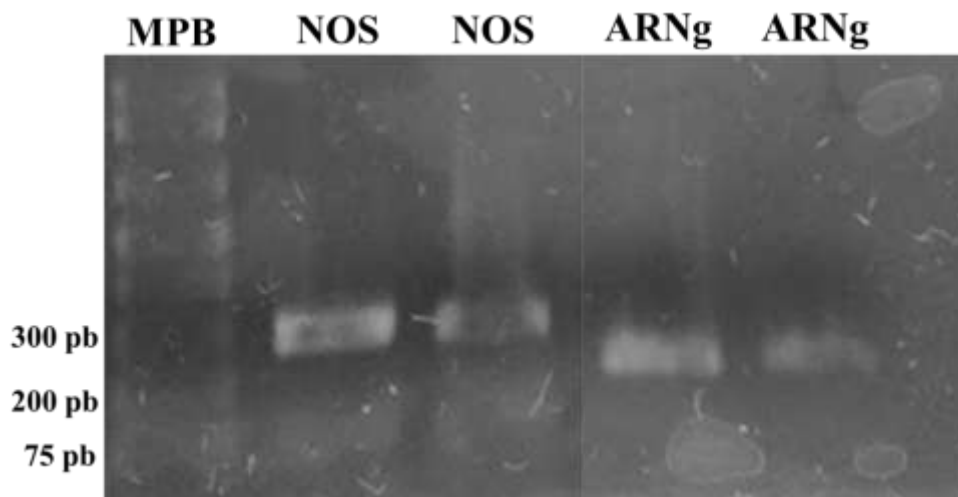


Figura. 12. Electroforesis del producto de PCR para la amplificación del promotor NOS, así como la secuencia guía ARNg. **MPB**, corresponde al marcador de pares de bases GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder de thermoscientific.

Desarrollo del constructo NOS:ARNg

Para desarrollar el constructo se ligaron el promotor NOS y la secuencia del ARNg mediante T4 ligasa, dando como resultado un único fragmento de aproximadamente 472 pb. La electroforesis en gel de agarosa reveló una banda brillante de entre 400 y 500 pb, según

el marcador de pares de bases GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder de thermoscientific, como resultado de la amplificación mediante PCR del producto de la ligación obtenido, por lo que se asume que la ligación entre ambos fragmentos fue exitosa (figura 13). Esta banda correspondiente a la amplificación del producto de ligación fue escindida del gel y purificada para su posterior uso.

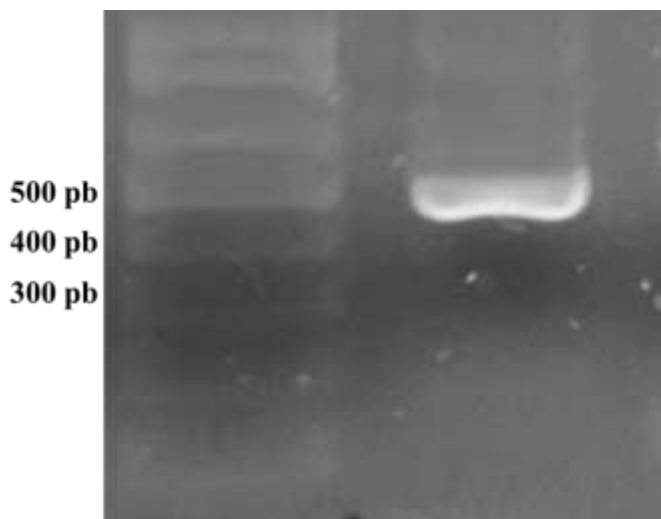


Figura 13. Electroforesis de la amplificación del producto de ligación NOS:ARNg.

Clonación de los fragmentos de interés en el plásmido de expresión y transformación bacteriana

Una vez purificado el constructo NOS:ARNg, se procedió a su inserción al plásmido de expresión en para plantas PHD-m-Cherry, previamente digerido con la enzima de restricción *MluI*, mediante ligación con T4 ligasa. Posteriormente, el producto de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli DH5αCT*.

El primer indicio sobre el éxito en la clonación del constructo NOS:ARNg en el plásmido de expresión en plantas PHD-m-Cherry, fue el crecimiento de colonias de bacterias transformadas en medio LB enriquecido con espectinomicina, debido a la resistencia a este antibiótico proporcionada por el plásmido (figura 14). Se observaron colonias de color beige característico, algunas puntiformes y otras con bordes irregulares debido a un crecimiento

excesivo. Se tomó cuidadosamente una muestra de la parte central de cada colonia para realizar una selección y resiembra de estas.

Para asegurar la presencia del constructo NOS:ARNg, se purificó el plásmido a partir de las colonias seleccionadas anteriormente y se realizó PCR utilizando una mezcla de oligonucleótidos específicos del constructo. La electroforesis en gel de agarosa muestra bandas brillantes del tamaño correspondiente al constructo (figura 15), obtenidas a partir de muestras de plásmido purificado. Se puede observar en la figura 15 que **D** se encuentra a la misma altura que **B**, lo que sugiere que la banda observada en **D** corresponde al constructo NOS:ARNg, confirmando que la inserción de dicho constructo al plásmido de expresión fue exitosa y que se encuentra presente en las bacterias transformadas. Esto confirma que el proceso inserción de constructo al plásmido fue exitoso y dio lugar al plásmido PHD-m-Cherry-NOS:ARNg.



Figura 14. Crecimiento bacteriano de células de *E. coli* DH5 α -CT sometidas al proceso de transformación bacteriana mediante choque térmico, con el plásmido clonado PHD-m-Cherry-NOS:ARNg.

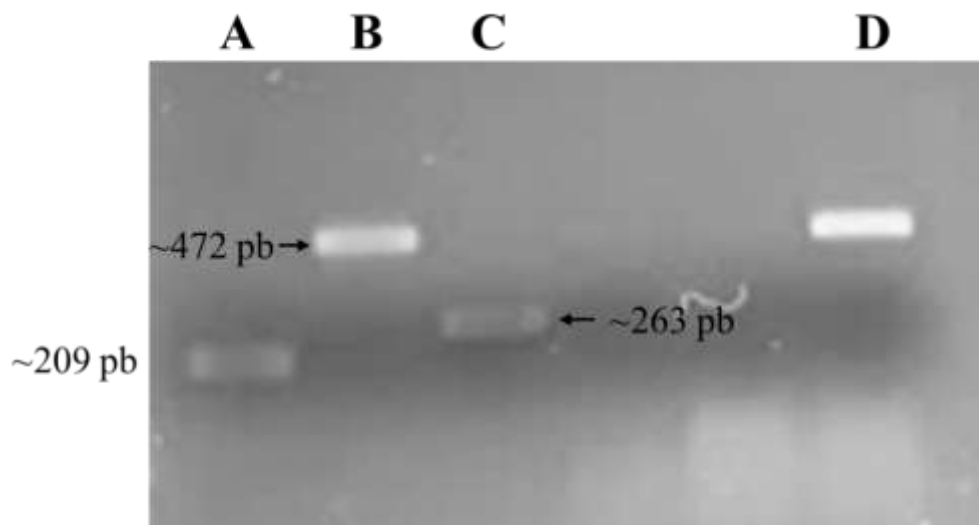


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de PCR para identificar el constructo NOS:ARNg. La banda **A** corresponde al ARNg purificado, **B**, corresponde al constructo NOS:ARNg purificado, **C** al promotor NOS purificado y **D** al producto de PCR obtenido a partir del plásmido purificado.

Para la clonación de la secuencia codificante de Cas13, se partió con la digestión del plásmido PHD-m-Cherry-NOS:ARNg con la enzima de restricción *XhoI* para poder insertar la secuencia de Cas13, de igual forma la secuencia codificante de Cas13 fue obtenida mediante amplificación por PCR a partir de plásmido 79150 -R. En la figura 16 se observan bandas muy tenues que corresponde a la fragmentación del plásmido PHD-m-Cherry-NOS:ARNg como el resultado de la digestión enzimática con *XhoI* (figura 16 C y D) y de menor tamaño al plásmido sin digerir (figura 16 B), lo que indica que la digestión enzimática se llevó a cabo de manera correcta. De igual forma se aprecia una banda brillante como resultado de la amplificación de Cas13 (figura 16 E), que migra a una distancia similar a 4000 pb según con el marcador de pares de bases BIO-HÉLICE -DM015-R500 utilizado (figura 16A), lo que indica que la amplificación de la secuencia codificante de Cas13, de aproximadamente 4163 pb, también fue exitosa. Los productos de digestión y de PCR fueron escindidos del gel para su purificación y posterior uso.

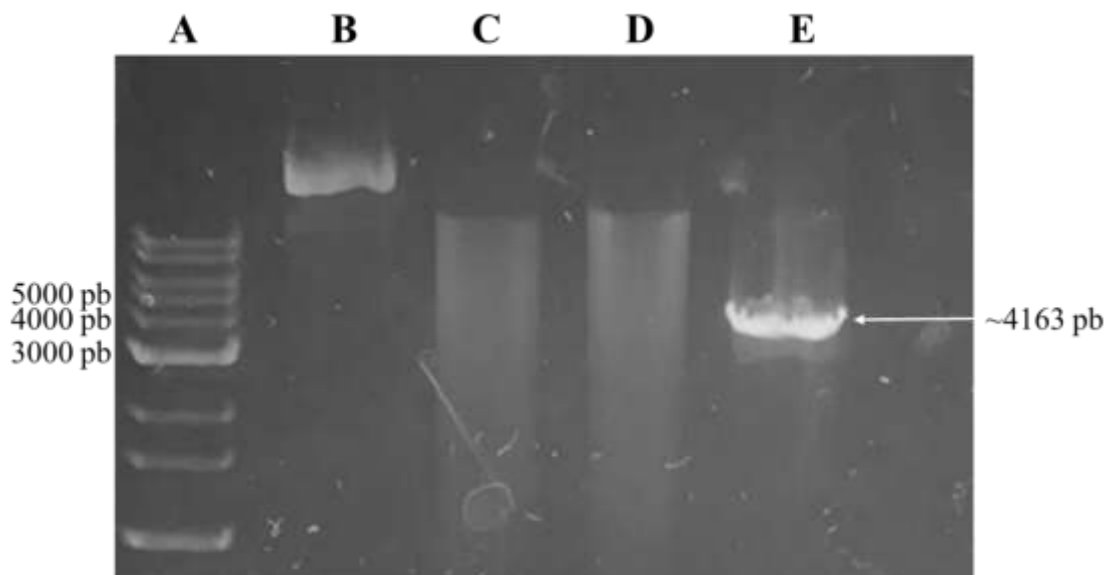


Figura.16. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. **A:** Marcador de pares de bases BIO-HÉLICE -DM015-R500, **B:** plásmido PHD-m-Cherry-NOS:ARNg purificado sin digerir; **C** y **D:** producto de la digestión enzimática de PHD-m-Cherry-NOS:ARNg con la enzima *XhoI*, **E:** producto de PCR para la amplificación de la secuencia codificante de Cas13.

Una vez purificada la secuencia codificante de Cas13, se procedió a clonarla al plásmido PHD-m-Cherry-NOS:ARNg, previamente digerido con *XhoI*, mediante ligación enzimática por T4 ligasa. El producto de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli DH5αCT*.

Se observó crecimiento bacteriano en medio sólido LB sólido enriquecido con espectinomicina, con colonias puntiformes y algunas con bordes irregulares del color característico de la cepa utilizada (figura 17), lo que indicó que la transformación bacteriana se había realizado con éxito, además mostró la posibilidad de que el resultado de la ligación había sido favorable. Se tomó una muestra de la parte central de algunas colonias para resiembra y poder continuar con la extracción de plásmido.

De igual manera, para asegurar la presencia de Cas13 en el plásmido, se realizó una amplificación por PCR a partir del plásmido purificado, utilizando oligonucleótidos específicos para la secuencia codificante de Cas13, así una muestra de Cas13 purificado

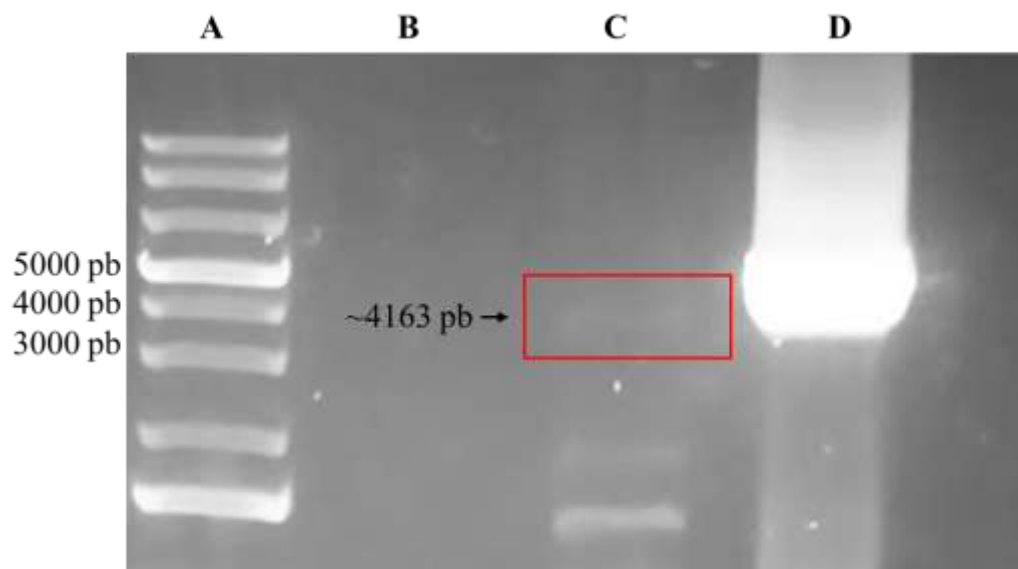


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para identificar a la secuencia codificante de Cas13 en el plásmido PHD-m-Cherry-NOS:ARNg-Cas13. **A:** marcador de pares de bases GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder de termoscientific, **B:** el control negativo de la prueba, **C:** fragmento de ~4163 pb correspondiente a Cas13, **D:** control positivo de la PCR para Cas13.

Prueba de digestión enzimática para verificar la presencia y el sentido de Cas13

Para confirmar la presencia de Cas13 en el plásmido PHD-m-Cherry-NOS:ARNg-Cas13 y determinar el sentido de la inserción, se realizó una digestión con la enzima *Eco 32I*.

Los sitios de restricción para *Eco 32I* presentes en el plásmido arrojarían distintos resultados según el sentido de la secuencia de Cas13, como ya se ha mencionado antes, la presencia en sentido de la secuencia codificante de Cas13 estaría evidenciada por la presencia de un patrón de tres bandas de aproximadamente 5,524 pb, 3,609 pb y 11,200 pb, mientras que la inserción en antisentido produciría dos bandas de aproximadamente 11,200 pb y 4,800 pb. Por otro lado, la ausencia de la secuencia mostraría un patrón de bandas de 3,900 pb y 13,000 pb después de la digestión enzimática. Consiente

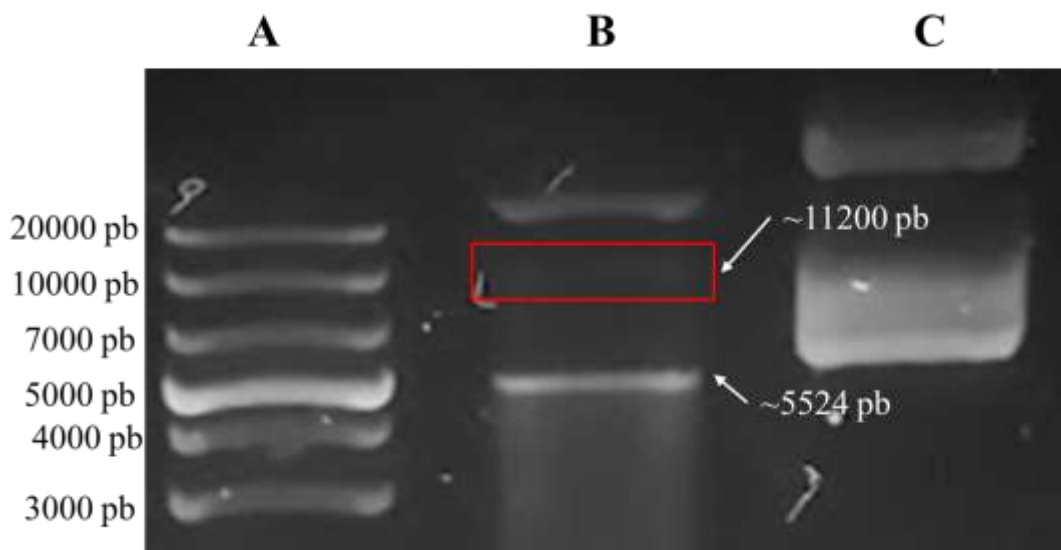


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión enzimática realizada al plásmido PHD-m-Cherry-NOS:ARNg-Cas13 con la enzima *Eco 32I*. **A**, es el marcador de pares de bases GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder de thermoscientific, **B**, plásmido PHD-m-Cherry-NOS:ARNg-Cas13 digerido con *Eco 32I*, se observa una banda cercana a 5000 pb y otra mayor a 10000 pb. **C**, muestra al plásmido PHD-m-Cherry-NOS:ARNg-Cas13 sin digerir.

El resultado de la digestión enzimática fue un patrón de bandas de tamaño aproximando a 5,524 y 11,200 pb, lo que sugiere la clonación en sentido de la secuencia codificante de Cas13 en el plásmido (figura 19 **B**). Aunque no es posible apreciar la tercera banda de 3609 pares de bases en el patrón de bandas, la presencia de dos bandas del patrón esperado, aunado a los resultados de la prueba de PCR, aseguran la inserción adecuada de la secuencia de Cas13 al plásmido.

Verificación de la identidad del constructo mediante secuenciación

Para verificar la identidad del constructo, se llevó a cabo la secuenciación del plásmido PHD-m-Cherry-NOS:ARNg-Cas13. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el software BLAST de NCBI para corroborar que correspondieran a los fragmentos de interés. La figura 20 muestra parte del resultado del alineamiento de Cas13, en el genoma de *Leptotrichia shahii*, organismo del que se obtuvo la proteína Cas13 (Watanabe *et al.*, 2019),

el resultado del alineamiento mostró un porcentaje de identidad del 74%. De igual forma, se realizó un alineamiento del fragmento de Ca13 con la secuencia completa de Cas13 presente en el plásmido pC001 - huLshC2C2-MBP disponible en Addgene (#79150) y purificado en el Laboratorio de Cultivos Vegetales, de donde se extrajo a Cas13 para la construcción de la plataforma, la figura 21, muestra el parte de resultado del alineamiento con un porcentaje de identidad del 100%. La figura 22, muestra el resultado del alineamiento de la secuencia NOS obtenida media secuenciación, con el genoma de *Agrobacterium radiobacter*, debido a que no se encuentra y fue extraído del género *Agrobacterium* (De Guillermo y Fernandez, 2016), el porcentaje de identidad fue del 100%. La alineación completa de ambas secuencias, así como las secuencias obtenidas del proceso de secuenciación, se muestran en los anexos de este documento.

Cas13	4	TGGTACGAGGTGCGAGATAAGAAAGACTTCAAGATCAAGCGAAAGGTGAAAGTCAAGCGG	63
<u>Sbjct</u>	123143	TGGTATGAAGTTCGTGATAAAAAAGATTTTAAATAAAACGAAAGTAAAAGTTAAAAGG	123202
Cas13	64	AATTATGACGGGAACAAGTACATTCTGAACATCAACGAAAACAACAACAAGAGAAGATC	123
<u>Sbjct</u>	123203	AACTATGATGGAAACAAATACATTTTAAATATTAATGAAAATAATAATAAGAAAAAATT	123262
Cas13	124	GACAACAACAAGTTCATCAGAAAGTACATCAACTACAAGAAAAACGATAATATTCTGAAG	183
<u>Sbjct</u>	123263	GATAATAATAAATTTATTAGAAAATATATTAATTACAAAAAAATGATAATATTCTTAAA	123322
Cas13	184	GAGTTCACTAGGAAATTTTCATGCAGGAAATATCCTGTTCAAACGAAGGGCAAAGAAGGG	243
<u>Sbjct</u>	123323	GAATTTACAAGAAAATTTTCATGCAGGAAATATTCTATTTAAGTTGAAAGGTAAAGAAGGA	123382
Cas13	244	ATCATTAGAATTGAGAATAACGACGACTTCCTGGAGACAGAGGAAGTGGTGTGTATATC	303
<u>Sbjct</u>	123383	ATCATAAGAATAGAAAATAATGATGATTTTTTGGAAACAGAAGAAGTTGTATTATATATA	123442
Cas13	304	GAGGCCTACGGCAAGAGCGAGAAGCTGAAAGCACTGGGGATCACAAAGAAAAAGATCATT	363
<u>Sbjct</u>	123443	GAAGCATATGGAAAATCTGAGAAATTGAAAGCATTGGGGATTACAAAAAGAAAATAATA	123502
Cas13	364	GACGAGGCCATCAGGCAGGGCATTACTAAGGACGATAAAAAAGATCGAGATCAAGCGACAG	423
<u>Sbjct</u>	123503	GATGAAGCAATTAGGCAAGGAATAACTAAAGATGATAAAAAAATAGAAATAAGAGACAA	123562

Figura 20. Resultado de parte del alineamiento de un fragmento de la secuencia de Cas13 utilizada en la plataforma construida obtenida a partir de secuenciación, con el genoma de *Leptotrichia shahii*.

Cas13	1	CGGTGGTACGAGGTGCGAGATAAGAAAGACTTCAAGATCAAGCGAAAGGTGAAAGTCAAG	60
Sbjct	25	CGGTGGTACGAGGTGCGAGATAAGAAAGACTTCAAGATCAAGCGAAAGGTGAAAGTCAAG	84
Cas13	61	CGGAATTATGACGGGAACAAGTACATTCTGAACATCAACGAAAACAACAACAAAGAGAAG	120
Sbjct	85	CGGAATTATGACGGGAACAAGTACATTCTGAACATCAACGAAAACAACAACAAAGAGAAG	144
Cas13	121	ATCGACAACAACAAGTTCATCAGAAAAGTACATCAACTACAAGAAAAACGATAATATTCTG	180
Sbjct	145	ATCGACAACAACAAGTTCATCAGAAAAGTACATCAACTACAAGAAAAACGATAATATTCTG	204
Cas13	181	AAGGAGTTCCTAGGAAATTTTCATGCAGGAAATATCCTGTTCAAACGAAGGGCAAAGAA	240
Sbjct	205	AAGGAGTTCCTAGGAAATTTTCATGCAGGAAATATCCTGTTCAAACGAAGGGCAAAGAA	264
Cas13	241	GGGATCATTAGAATTGAGAATAACGACGACTTCTGGAGACAGAGGAAGTGGTGCTGTAT	300
Sbjct	265	GGGATCATTAGAATTGAGAATAACGACGACTTCTGGAGACAGAGGAAGTGGTGCTGTAT	324
Cas13	301	ATCGAGGCCTACGGCAAGAGCGAGAAGCTGAAAGCACTGGGGATCACAAAGAAAAAGATC	360
Sbjct	325	ATCGAGGCCTACGGCAAGAGCGAGAAGCTGAAAGCACTGGGGATCACAAAGAAAAAGATC	384
Cas13	361	ATTGACGAGGCCATCAGGCAGGGCATTACTAAGGACGATAAAAAGATCGAGATCAAGCGA	420
Sbjct	385	ATTGACGAGGCCATCAGGCAGGGCATTACTAAGGACGATAAAAAGATCGAGATCAAGCGA	444
Cas13	421	CAGGAGAACGAGGAAGAGATCGAAATTGACATCCGGGATGAGTACACTAATAAGACCCTG	480
Sbjct	445	CAGGAGAACGAGGAAGAGATCGAAATTGACATCCGGGATGAGTACACTAATAAGACCCTG	504

Figura 21. Resultado de parte del alineamiento de un fragmento de la secuencia de Cas13 con la secuencia completa de Cas13 extraída del plásmido pC001 - huLshC2C2-MBP disponible en Addgene (#79150).

NOS	7	CCGATGACGCGGGACAAGCCGTTTTACGTTTGGAAGTACAGAACCGCAACGTTGAAGGA	66
Sbjct	45094	CCGATGACGCGGGACAAGCCGTTTTACGTTTGGAAGTACAGAACCGCAACGTTGAAGGA	45035
NOS	67	GCCACTCAGCCGCGGGTTTCTGGAGTTTAATGAGCTAAGCACATACGTCAGAAACCATTA	126
Sbjct	45034	GCCACTCAGCCGCGGGTTTCTGGAGTTTAATGAGCTAAGCACATACGTCAGAAACCATTA	44975
NOS	127	TTGCGCGTTCAAAAGTCGCCTAAGGTCATATCAGCTAGCAAATATTTCTTGTCAAAAAT	186
Sbjct	44974	TTGCGCGTTCAAAAGTCGCCTAAGGTCATATCAGCTAGCAAATATTTCTTGTCAAAAAT	44915
NOS	187	GCTCCACTGACGTTCCATAAATCCCTCGGTATCCAATTAGAGTCTCATATTCACTCTC	246
Sbjct	44914	GCTCCACTGACGTTCCATAAATCCCTCGGTATCCAATTAGAGTCTCATATTCACTCTC	44855
NOS	247	AATCCAAATAATCTGCA	263
Sbjct	44854	AATCCAAATAATCTGCA	44838

Figura 22. Resultado de alineamiento de una secuencia de NOS obtenida a partir de secuenciación, con el genoma de *Agrobacterium radiobacter*. Puede observarse un alto grado de similitud.

Transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Una vez verificada la presencia y la identidad de los fragmentos de interés en el plásmido de expresión, se procedió a la transformación de células de *Agrobacterium tumefaciens* para continuar con la transformación de plantas. El crecimiento de colonias en placas de medio LB enriquecido con espectinomicina y rifampicina fue el primer indicio del éxito de la transformación, se observaron colonias puntiformes de color beige característico.

Fueron seleccionadas cuidadosamente varias colonias para su resiembra en medio sólido y líquido con el fin de extraer plásmido para verificar la presencia de los fragmentos de interés. Para ello, se realizó una amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos para el ARNg, la electroforesis en gel de agarosa mostró bandas de tamaño correspondiente al esperado (figura 23) lo que permitió suponer que el plásmido presente en *Agrobacterium tumefaciens* se encuentra íntegro y contiene los fragmentos de interés.

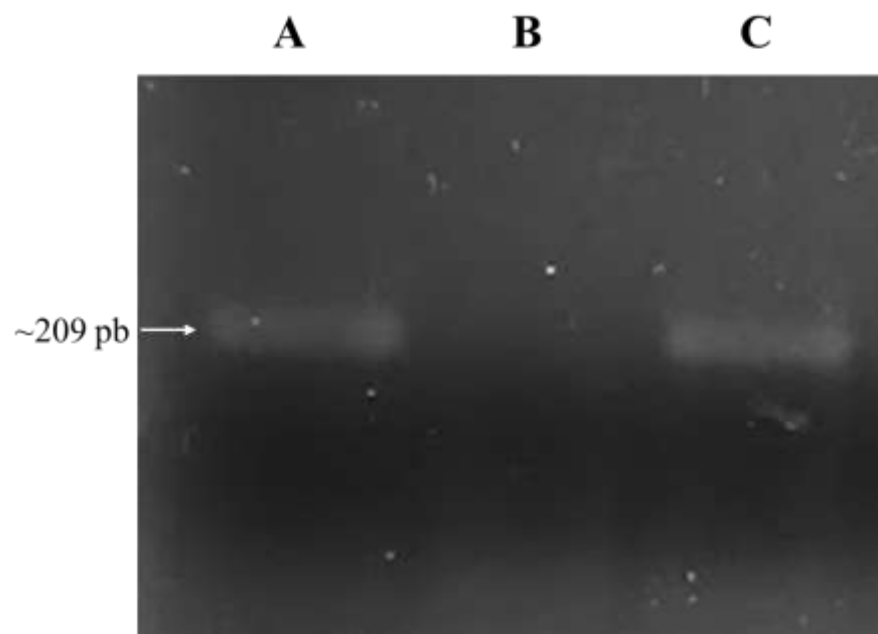


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa del producto de la PCR del ARNg a partir de plásmido PHD-m-Cherry-NOS:ARNg-Cas13 extraído de *Agrobacterium*. **A** muestra la banda correspondiente al ARNg purificado, **B**, es el control negativo de la prueba y **C** es el ARNg resultante de la PCR

Transformación de plantas de *Nicotina tabacum* con la plataforma construida mediante agroinfiltración con *Agrobacterium tumefaciens*

Una vez verificada la integridad del plásmido PHD-m-Cherry-NOS:ARNg-Cas13 en *Agrobacterium tumefaciens*, se procedió con la transformación de plantas de tabaco cultivadas en el laboratorio en condiciones de luz y temperatura controladas, mediante la técnica de agroinfiltración, inoculando cuidadosamente un volumen de cultivo de células de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas sobre el envés de las hojas de tabaco con ayuda de una jeringa estéril (figura 24).



Figura 24. Transformación de plantas de *N. tabacum* mediante agroinfiltración.

Posterior a la agroinfiltración, las plantas se colocaron nuevamente en la incubadora y se mantuvieron con periodos de luz y temperatura controlados durante 5 días. Después de este periodo se evaluó la respuesta de la planta ante la transformación. Las plantas inoculadas presentaron un aspecto sano, sin marchitar, con hojas brillantes y sin daño aparente por la agroinfiltración, lo que indicó que el proceso se había realizado adecuadamente (figura 25).



Figura 25. Planta de *N. tabacum* después de 5 días de la agroinfiltración, la planta se muestra sin daño excesivo, fresca y brillante, indicando que el proceso de transformación se realizó correctamente.

Extracción de ARN total a partir de plantas de *Nicotina tabacum* transformadas

Pasado el periodo de incubación post transformación, se tomaron segmentos de las hojas de las plantas transformadas y de una planta sin transformar (control negativo), en zonas aledañas a donde se realizó la agroinfiltración para la extracción de ARN total.

Posterior a la extracción del ARN se realizó electroforesis en gel de agarosa para evaluar la calidad del material obtenido. En la figura 26 se observan bandas pertenecientes al patrón electroforético del ARN total de las plantas de tabaco.

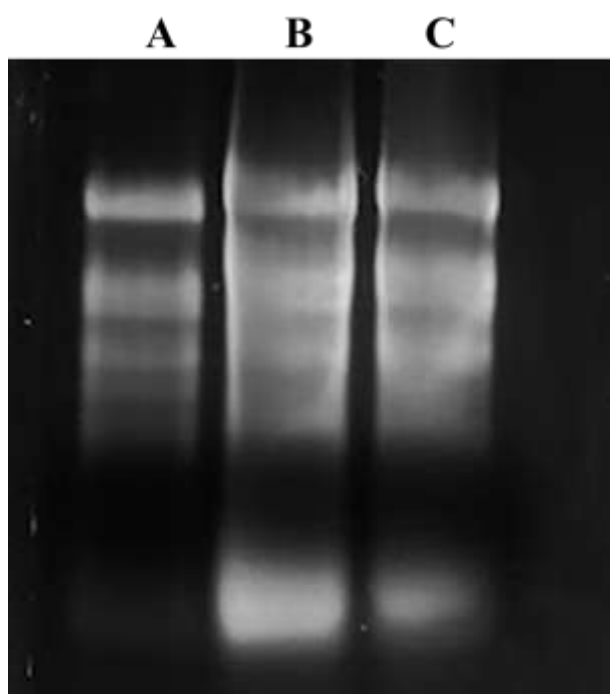


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa del ARN total obtenido a partir de plantas de *N. tabacum*. **A**: ARN de plantas control. **B** y **C**: ARN obtenido a partir de plantas transformadas (réplica 1 y 2 respectivamente).

Evaluación de la expresión de Cas13 y ARNg en plantas de *Nicotina tabacum* transformadas

Para comprobar que la plataforma construida se encontraba en el genoma de la planta y que además se expresaba, se realizó una PCR con oligonucleótidos específicos para un segmento

de la secuencia de Cas13 y para el ARNg, utilizando ADNc construido a partir del ARN total obtenido anteriormente. La electroforesis de la PCR realizada mostró una banda brillante de tamaño similar al del segmento determinado de Cas13 (figura 28), de igual forma, se observó una banda brillante de tamaño aproximado al ARNg (figura 27), lo que confirma la presencia y expresión de la plataforma construida.

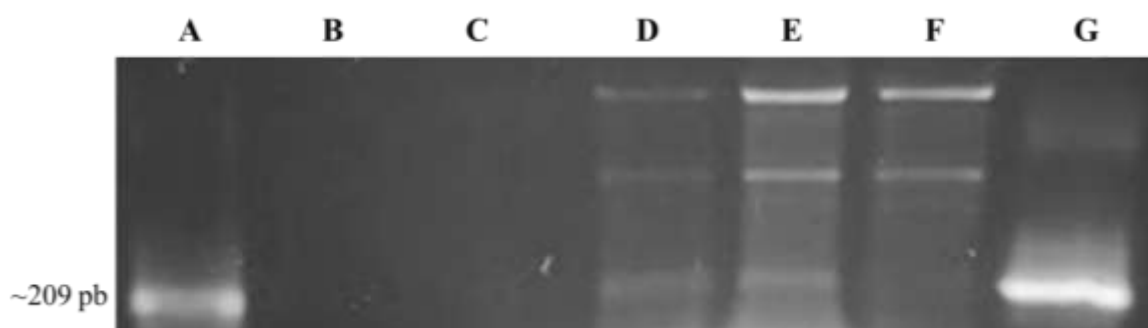


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR a partir de ADNc utilizando oligonucleótidos específicos de ARNg. El carril marcado con **A**, muestra ARNg purificado, **B**: carril sin muestra, **C**: control negativo de la PCR, **D**: réplica 1, **E**: réplica 2, **F**: PCR a partir de ADNc de la planta control (no transformada con el constructo) y **G**: muestra el control positivo de la PCR.

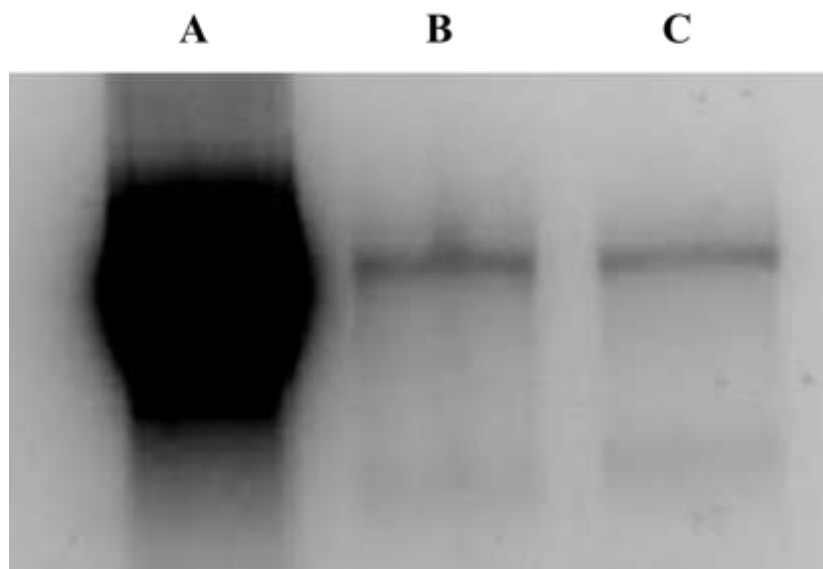


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa de PCR para amplificar un fragmento de la secuencia codificante de Cas13 a partir de ADNc construido, **A**, muestra el control positivo de la PCR, **B** y **C** son las réplicas 1 y 2, respectivamente, de la prueba realizada.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Construcción de plataforma de expresión

El sistema CRISPR-Cas13 es una herramienta útil para el procesamiento de ARN, lo que abre una amplia gama de posibilidades para la regulación de la expresión genética a nivel transcriptómico, el tratamiento de enfermedades y la defensa contra patógenos, como virus de ARN (Zhu *et al.*, 2024). De igual forma se ha demostrado que es posible expresar de manera funcional dicho sistema en organismo vegetales, lo que permite el desarrollo de plantas resistentes a enfermedades y el procesamiento de transcritos propios de la planta (Mahas *et al.* 2019). En este trabajo se desarrolló una plataforma de expresión para plantas que permite la síntesis de la nucleasa Cas13 y un ARNg, éste último puede ser sustituido dependiendo de las necesidades; no obstante, comprobar que los elementos que componen al sistema estuvieran presentes, fue fundamental, como es el caso del constructo NOS:ARNg, para el que se observaron las bandas correspondientes al promotor NOS y el ARNg en geles de agarosa (figura 12) lo que permitió su posterior purificación y ligación para el desarrollo del constructo.

Debido a que NOS es uno de los promotores de expresión más usado en la transformación genética de plantas (De Guillermo y Fernandez, 2016), se consideró para generar la construcción de la secuencia NOS:ARNg (figura 10), con la finalidad de inducir la expresión constitutiva del ARNg que dirigirá la actividad de la nucleasa Cas13.

El otro elemento relevante del sistema es la secuencia codificante para la nucleasa Cas13, cuya ligación al plásmido de expresión fue verificada mediante PCR (figura 18) y digestión enzimática (figura 19), aunque el patrón electroforético de los productos de PCR mostró bandas tenues, el patrón de bandas obtenido en las pruebas de digestión enzimática respalda que la clonación de la secuencia codificante de Cas13 fue exitosa, ya que la digestión del ADN con enzimas de restricción es útil para conocer los cambios que se han realizado en

dicha secuencia, al producir patrones específicos que pueden observarse en geles de electroforesis (Jaber *et al.*, 2022) y que además de la presencia del fragmento a integrar al plásmido vector, también pueden ser indicativos de la direccionalidad en la que fue integrado, lo que resulta relevante para el funcionamiento de la plataforma, de igual forma, los resultados obtenidos del proceso de secuenciación confirman de manera contundente la presencia de Cas13.

La construcción de la plataforma de expresión fue exitosa al poderse evidenciar la presencia de NOS:ARNg y la secuencia codificante de Cas13 en el plásmido de expresión PHD-m-Cherry siendo verificados mediante PCR, digestión enzimática y secuenciación.

Por su parte, el crecimiento de colonias de *E. coli* y de *A. tumefaciens* en medios enriquecidos con antibióticos, indican que el proceso de transformación bacteriana fue exitoso.

Expresión del sistema en tabaco

La transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* con plásmidos recombinantes, es una técnica utilizada para la modificación genética de plantas (Ebrahimi y Hashemi, 2024), la cual puede usarse como un sistema rápido, y que permite probar en un lapso de tiempo corto la eficiencia de las construcciones generadas en plásmido de expresión. Las plantas transformadas no presentaron daño aparente ni síntomas de estrés post-inoculación, sugiriendo que el procedimiento no afectó negativamente la viabilidad de los tejidos vegetales (figura 25). Es importante mencionar que la agroinfiltración con *Agrobacterium*, representa un sistema de transformación transitorio donde la expresión de los fragmentos insertados a la célula vegetal puede diferir de la expresión estable de líneas transgénicas. No obstante, la expresión transitoria no es del todo una desventaja, ya que ese ha demostrado que es eficiente, además de disminuir problemas de bioseguridad y regulatorios (Kaur *et al.*, 2021).

La extracción de ARN total a partir de hojas de las plantas transformadas, la síntesis de ADNc a partir del mismo ARN y la posterior detección mediante PCR de bandas correspondientes tanto al ARNg como a Cas13, permitieron identificar la expresión de los genes de interés (Polyak, 2003), indicando que el sistema es accesible para ser transcrito a ARN.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que es posible la construcción y expresión de una plataforma con el sistema CRISPR-Cas13 en plantas con desarrollo natural lo que suma una evidencia clara para su potencial uso como herramienta biotecnológica para la regulación de transcritos propios y externos de la planta.

Aunque en esta ocasión los objetivos solo se limitaron a construir una plataforma inespecífica y comprobar su expresión en plantas, la presencia de un sitio de restricción en la secuencia del ARNg utilizado, abre la posibilidad de dirigir la plataforma a blancos específicos.

Sin embargo, a pesar de que se hayan insertado correctamente los elementos del sistema en un plásmido de expresión en plantas, se ha demostrado que la funcionalidad del sistema CRISPR-Cas13 no solo depende de estos factores, sino también de otros como lo son la arquitectura del ARNg y la conformación estructural de ARN diana (Abudayyeh *et al.*, 2016). De esta forma, a pesar de haberse demostrado la expresión del ARNg y de Cas13 a nivel transcriptómico en plantas, no es posible asegurar su correcta actividad catalítica o su funcionalidad específica, por lo que es necesario continuar con estudios que muestren niveles cuantificables de la proteína Cas13 (nivel traduccional), así como ensayos que permitan observar de manera directa su funcionalidad.

Finalmente, es importante destacar el análisis de los posibles efectos colaterales derivados de la actividad inespecífica de Cas13. Aunque Ebrahimi y Hashemi en 2024, mencionan que dicha actividad colateral no se presenta en el funcionamiento de CRISPR-Cas13 en células eucariotas, estos aspectos son esenciales para consolidar la aplicación práctica del sistema y sentar bases sólidas para su uso en el mejoramiento vegetal y control de enfermedades virales, como una técnica accesible no solo para la comunidad científica en investigación vegetal, sino también para la población general en la solución de problemas de producción agrícola.

CONCLUSIÓN

El sistema CRISPR-Cas13 puede ser utilizado como una importante herramienta para la regulación de la expresión genética a nivel transcriptómico al ir dirigido a moléculas de ARN, lo que abre una ventana de posibilidades para su uso el desarrollo de plantas para la investigación vegetal, así como en la defensa contra fitopatógenos.

Los resultados de este trabajo demuestran que es posible construir y expresar en plantas una plataforma molecular con los elementos necesarios para el funcionamiento de CRISPR-Cas13. La presencia de bandas brillantes en las electroforesis de PCR de los diferentes elementos de la plataforma muestra la obtención exitosa de dichos componentes: el ARNg, el promotor constitutivo NOS y la secuencia codificante de Cas13. De igual forma, su correcta inserción en el plásmido de expresión PHD-m-Cherry, así como la transformación eficiente de la cepa de mantenimiento (*E. coli DH5 α CT*) y posteriormente de plantas de tabaco por *Agrobacterium* mediante agroinfiltración.

Por su parte, la presencia de bandas del tamaño aproximado a las secuencias del ARNg y Cas13 obtenidas a partir de la amplificación por PCR del ADNc sugieren la expresión de estos componentes en las plantas de tabaco. Mas allá de verificar la funcionalidad de la plataforma ante un ARN diana, la expresión de Cas13 abre una ventana de posibilidades para el procesamiento de ARN en sistemas vegetales. Estos hallazgos muestran que es posible expresar los elementos del sistema CRISPR-Cas13 en plantas modelo, lo que sienta las bases para futuros estudios enfocados en probar su efectividad para regular la expresión génica a nivel postranscripcional, inducir resistencia frente a virus y desarrollar cultivos con características mejoradas.

Aunque los resultados obtenidos satisfacen el objetivo principal de este trabajo que es desarrollar una plataforma con los elementos necesarios para el funcionamiento del sistema CRISPR-Cas13, la medición de niveles cuantificables de Cas13, así como su actividad catalítica específica simbolizan una de las principales perspectivas de este proyecto. Si bien,

la falta de pruebas de funcionalidad representa una limitante importante, los avances aquí logrados, permite fundamentar y plantear trabajos más dirigidos que analicen la eficiencia y especificidad de la plataforma, así como su potencial en contextos más complejos. La consolidación de estas investigaciones permitirá ampliar el potencial de CRISPR-Cas13 como una herramienta innovadora para enfrentar retos de escala mundial, particularmente en la investigación vegetal, en el control de enfermedades y el mejoramiento de la productividad agrícola.

REFERENCIAS

1. Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J., Belanto, J. J., Verdine, V., Cox, D. B. T., Kellner, M. J., Regev, A., Lander, E. S., Voytas, D. F., Ting, A. Y., & Zhang, F. (2017). RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 550(7675), 280–284. <https://doi.org/10.1038/nature24049>
2. Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Kellner, M. J., & Zhang, F. (2019). Nucleic acid detection of plant genes using CRISPR-Cas13. *The CRISPR Journal*, 2(3), 165–171. <https://doi.org/10.1089/crispr.2019.0011>
3. Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., Cox, D. B. T., Shmakov, S., Makarova, K. S., Semenova, E., Minakhin, L., Severinov, K., Regev, A., Lander, E. S., Koonin, E. V., & Zhang, F. (2016). C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 353(6299), aaf5573. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5573>
4. Ashraf, S., Zubair, M., Asif, M., Zafar, H., Ali, H., Qari, S., & Ahmad, A. (2022). RNA editing with CRISPR/Cas13. En A. Ahmad, S. H. Khan, & Z. Khan (Eds.), *The CRISPR/Cas toolkit for genome editing* (pp. 219–254). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-16-6305-5_7
5. Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
6. Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8), 2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
7. Bot, J. F., van der Oost, J., & Geisen, N. (2022). The double life of CRISPR-Cas13. *Current Opinion in Biotechnology*, 78, 102789. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102789>

8. Burmistrz, M., Krakowski, K., & Krawczyk-Balska, A. (2020). RNA-targeting CRISPR–Cas systems and their applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1122. <https://doi.org/10.3390/ijms21031122>
9. Correa, M. F., Adjounian, H., & Adjounian, S. H. (2008). Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia: Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 27(1), 22–25. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642008000100006
10. Cox, D. B. T., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Franklin, B., Kellner, M. J., Joung, J., & Zhang, F. (2017). RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, 358(6366), 1019–1027. <https://doi.org/10.1126/science.aag0180>
11. De Guglielmo, Z. M., & Fernández, R. (2016). Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 119–128.
12. Ebrahimi, V., & Hashemi, A. (2024). CRISPR-based gene editing in plants: Focus on reagents and their delivery tools. *BioImpacts*, 15, 30019–30019. <https://doi.org/10.34172/bi.30019>
13. Elizondo-Luevano, J. H., García-Sotelo, L. A., Cárdenas-Paredes, I. E., Dios-Romero, V., Villanueva-Terán, C., & Kačániová, M. (2024). Edición de genes y CRISPR-Cas: Aplicaciones, avances y desafíos. *Scientia Agricolis Vita*, 2. <https://agricolis.uanl.mx/index.php/revista/article/view/11/23>
14. Esquerrá, B. (2022). Caracterización funcional y aplicación biotecnológica de nuevos sistemas CRISPR-Cas identificados en ambientes naturales de la provincia de Alicante [Tesis doctoral, Universidad de Alicante].
15. García, A. (2023). Sistemas CRISPR/Cas y su aplicación en la edición dirigida de genomas [Tesis de grado, Universidad de Jaén]. <https://crea.ujaen.es/server/api/core/bitstreams/192bdf1f-1cbf-48ce-92a3-6322ba073de9/content>
16. Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Lee, J. W., Essletzbichler, P., Dy, A. J., Joung, J., Verdine, V., Donghia, N., Daringer, N. M., Freije, C. A., Myhrvold, C., Bhattacharyya, R. P., Livny, J., Regev, A., Koonin, E. V., Hung, D. T., Sabeti, P. C.,

- Collins, J. J., & Zhang, F. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 356(6336), 438–442. <https://doi.org/10.1126/science.aam9321>
17. Grosjean, H. (2015). RNA modification: The golden period 1995–2015. *RNA*, 21(4), 625–626. <https://doi.org/10.1261/rna.049866.115>
 18. Huang, Z., Fang, J., Zhou, M., Gong, Z., & Xiang, T. (2022). CRISPR-Cas13: A new technology for the rapid detection of pathogenic microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1011399. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1011399>
 19. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
 20. Jaber, E., Kashif, M., Sun, H., & Asiegbu, F. O. (2022). Diagnostic tools and techniques in tree pathology. *En Forest Microbiology* (pp. 17–46). Academic Press.
 21. Kaur, M., Manchanda, P., Kalia, A., Ahmed, F. K., Nepovimova, E., Kuca, K., & Abd-Elsalam, K. A. (2021). Agroinfiltration mediated scalable transient gene expression in genome edited crop plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10882. <https://doi.org/10.3390/ijms221910882>
 22. Kavuri, N. R., Ramasamy, M., Qi, Y., & Mandadi, K. (2022). Applications of CRISPR/Cas13-based RNA editing in plants. *Cells*, 11(17), 2665. <https://doi.org/10.3390/cells11172665>
 23. Koeppe, S., Kawchuk, L., & Kalischuk, M. (2023). RNA interference: Past and future applications in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9755. <https://doi.org/10.3390/ijms24119755>
 24. Konermann, S., Lotfy, P., Brideau, N. J., Oki, J., Shokhirev, M. N., & Hsu, P. D. (2018). Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. *Cell*, 173(3), 665–676.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.033>
 25. Lammoglia-Cobo, M. F., Lozano-Reyes, R., García-Sandoval, C. D., Avilez-Bahena, C. M., Trejo-Reveles, V., Balam Muñoz-Soto, R., & López-Camacho, C. (2016). La revolución en ingeniería genética: Sistema CRISPR-Cas. *Investigación en*

- Discapacidad, 5(2), 116–118. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2016/ir162e.pdf>
26. Liu, L., & Pei, D.-S. (2022). Insights gained from RNA editing targeted by the CRISPR-Cas13 family. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11400. <https://doi.org/10.3390/ijms231911400>
 27. Lotfi, M., & Rezaei, N. (2020). CRISPR/Cas13: A potential therapeutic option of COVID-19. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110738. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110738>
 28. Mahas, A., Aman, R., & Mahfouz, M. (2019). CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants. *Genome Biology*, 20, 263. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1881-2>
 29. Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., van der Oost, J., & Koonin, E. V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 467–477. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>
 30. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksnys, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., Yan, W., ... Koonin, E. V. (2020). Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: A burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 18(2), 67–83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
 31. Marquardt, S., Petrillo, E., & Manavella, P. A. (2023). Cotranscriptional RNA processing and modification in plants. *The Plant Cell*, 35(6), 1654–1670. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac309>
 32. Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
 33. Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea,

- Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 36(1), 244–246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>
34. Mojica, F. J., Juez, G., & Rodríguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular Microbiology*, 9(3), 613–621. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x>
 35. Navarro, C., Díaz, M. P., Díaz, A., Durán, P., Castro, A., Gutiérrez, E., Cano, C., Carbonell-Zabaleta, A. K., & Bermúdez, V. (2024). Sistema CRISPR-Cas: Una perspectiva histórica y cultural. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 87(1–2), 5–38.
 36. Noriega, D., Valencia, A., & Villegas, B. (2016). ARN de interferencia (ARNi): Una tecnología novedosa con potencial para el control de insectos plaga. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 19(1), 25–35.
 37. O'Connell, M. R. (2019). Molecular mechanisms of RNA targeting by Cas13-containing type VI CRISPR–Cas systems. *Journal of Molecular Biology*, 431(1), 66–87. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.029>
 38. Polyak, K., & Meyerson, M. (2003). Gene expression: mRNA transcript analysis. En D. W. Kufe, R. E. Pollock, R. R. Weichselbaum, et al. (Eds.), *Holland-Frei Cancer Medicine* (6a ed.). BC Decker.
 39. Riveros-Maidana, R., Méndez-Ferreira, A., Benítez-Candia, N., Nara-Pereira, E., & Fernández-Ríos, D. (2020). Sistema CRISPR/Cas: Edición genómica de precisión. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 18(1), 97–107. <https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2020.018.01.97-107>
 40. Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox, D., Pyzocha, N., Yan, W., Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Severinov, K., Zhang, F., & Koonin, E. V. (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 15(3), 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184>
 41. Slaymaker, I. M., Mesa, P., Kellner, M. J., Kannan, S., Brignole, E., Koob, J., Feliciano, P. R., Stella, S., Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Strecker, J., Montoya, G., & Zhang, F. (2019). High-resolution structure of Cas13b and

- biochemical characterization of RNA targeting and cleavage. *Cell Reports*, 26(13), 3741–3751.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.094>
42. Soria, A. (2022). Estudio del uso del sistema CRISPR-Cas13 para la regulación de la expresión génica in vivo y para aplicaciones de diagnóstico in vitro [Tesis de grado, Universitat Politècnica de València].
 43. Wang, Y., Liu, J., Huang, B. O., Xu, Y. M., Li, J., Huang, L. F., Lin, J., Zhang, J., Min, Q. H., Yang, W. M., & Wang, X. Z. (2015). Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomedical Reports*, 3(2), 152–158. <https://doi.org/10.3892/br.2014.407>
 44. Watanabe, S., Cui, B., Kiga, K., Aiba, Y., Tan, X. E., Sato'o, Y., Kawauchi, M., Boonsiri, T., Thitiananpakorn, K., Taki, Y., Li, F. Y., Azam, A. H., Nakada, Y., Sasahara, T., & Cui, L. (2019). Composition and diversity of CRISPR-Cas13a systems in the genus *Leptotrichia*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2838. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02838>
 45. Yan, W. X., Chong, S., Zhang, H., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Cheng, D. R., & Scott, D. A. (2018). Cas13d is a compact RNA-targeting type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein. *Molecular Cell*, 70(2), 327–339.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.028>
 46. Zhan, X., Liu, W., Nie, B., Zhang, F., & Zhang, J. (2023). Cas13d-mediated multiplex RNA targeting confers broad-spectrum resistance against RNA viruses in potato. *Communications Biology*, 6, 85. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05205-2>
 47. Zhang, H., Dong, C., Li, L., Wasney, G. A., & Min, J. (2019). Structural insights into the modulatory role of the accessory protein WYL1 in the type VI-D CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Research*, 47(10), 5420–5428. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz269>
 48. Zhao, L., Qiu, M., Li, X., Yang, J., & Li, J. (2022). CRISPR-Cas13a system: A novel tool for molecular diagnostics. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1060947. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1060947>
 49. Zhu, G., Zhou, X., Wen, M., Qiao, J., Li, G., & Yao, Y. (2024). CRISPR–Cas13: Pioneering RNA editing for nucleic acid therapeutics. *BioDesign Research*, 6, 0041. <https://doi.org/10.34133/bdr.0041>

50. Zurita, M. (2021). El sistema CRISPR/Cas: Crónica de un premio Nobel anunciado. *Educación Química*, 32(3), 3–13. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2021.3.79714>

ANEXOS

Secuencia obtenida de un fragmento de Ca13 utilizada en la plataforma

CGGTGGTACGAGGTGCGAGATAAGAAAGACTTCAAGATCAAGCGAAAGGTGA
AAGTCAAGCGGAATTATGACGGGAACAAGTACATTCTGAACATCAACGAAAAC
AACAAACAAAGAGAAGATCGACAACAACAAGTTCATCAGAAAGTACATCAACT
ACAAGAAAAACGATAATATTCTGAAGGAGTTCACTAGGAAATTTTCATGCAGGA
AATATCCTGTTCAAACCTGAAGGGCAAAGAAGGGGATCATTAGAATTGAGAATAA
CGACGACTTCCTGGAGACAGAGGAAGTGGTGCTGTATATCGAGGCCTACGGCA
AGAGCGAGAAGCTGAAAGCACTGGGGATCACAAAGAAAAAGATCATTGACGA
GGCCATCAGGCAGGGCATTACTAAGGACGATAAAAAGATCGAGATCAAGCGA
CAGGAGAACGAGGAAGAGATCGAAATTGACATCCGGGATGAGTACACTAATA
AGACCCTGAACGACTGCTCCATCATTCTGCGCATCATTGAAAACGATGAACTG
GAGACAAAGAAGAGCATCTACGAGATCTTCAAGAACATCAATATGAGCCTGTA
TAAGATCATCGAGAAGATCATCGAAAACGAGACAGAAAAGGTGTTTGAAAAT
AGATACTACGAAGAGCACCTGAGGGAGAAGCTGCTGAAAGACGATAAG

Secuencia de constructo NOS:ARNg

ATGACGCGGGACAAGCCGTTTTACGTTTGGAAGTACAGAACCGCAACGTTGA
AGGAGCCACTCAGCCGCGGGTTTCTGGAGTTTAATGAGCTAAGCACATACGTC
AGAAACCATTATTGCGCGTTCAAAAGTCGCCTAAGGTCACTATCAGCTAGCAA
ATATTTCTTGTCAAAAATGCTCCACTGACGTTCCATAAATTCCCCTCGGTATCC
AATTAGAGTCTCATATTCCTCTCAATCCAAATAATCTGCACCACGCCAATATC
GAAGGCGACTAAAACGGAAGAGCTCGCTCTTCCAGATCTGGAAAAATGATGTG
ACAGTGGAATGAGAAGTAGGTGCATCTGCAAAGATTTGATTTCAGAGTTGATG
CCATTCATGATTTTTTTTAGAAGTATCATTTGTGTTTTTAGAATATAGAATTAAT
TCCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATA

Secuencia NOS:

TCTAGACCGATGACGCGGGACAAGCCGTTTTACGTTTGGAAGTACAGAACCG
CAACGTTGAAGGAGCCACTCAGCCGCGGGTTTCTGGAGTTTAATGAGCTAAGC

ACATACGTCAGAAACCATTATTGCGCGTTCAAAAAGTCGCCTAAGGTCCTATCA
GCTAGCAAATATTTCTTGTCAAAAATGCTCCACTGACGTTCCATAAATTCCCCT
CGGTATCCAATTAGAGTCTCATATTCCTCTCAATCCAAATAATCTGCA

Secuencia ARNg

CCACGCCAATATCGAAGGCGACTAAAACGGAAGAGCTCGCTCTTCCAGATCTG
GAAAAATGATGTGACAGTGGAATGAGAAGTAGGTGCATCTGCAAAGATTTGA
TTCAGAGTTGATGCCATTCATGATTTTTTTTTAGAAAGTATCATTGTGTTTTTAGA
ATATAGAATTAATTCCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGAATTC

Alineamiento de fragmento de un fragmento de Cas13 utilizada en la construcción de la plataforma con el genoma de *Leptotrichia shahii*.

Cas13	4	TGGTACGAGGTGCGAGATAAGAAAGACTTCAAGATCAAGCGAAAGGTGAAAGTCAAGCGG	63
Sbjct	123143	TGGTATGAAGTTCGTGATAAAAAAGATTTTAAAATAAAACGGAAAGTAAAGTTAAAAGG	123202
Cas13	64	AATTATGACGGGAACAAGTACATTCTGAACATCAACGAAAACAACAAGAGAAGATC	123
Sbjct	123203	AACATGATGGAAACAAATACATTTTAAATATTAATGAAAATAATAAAGAAAAAATT	123262
Cas13	124	GACAACAACAAGTTCATCAGAAAGTACATCAACTACAAGAAAAACGATAATATTCTGAAG	183
Sbjct	123263	GATAATAATAAATTTATTAGAAAATATATTAATTACAAAAAAATGATAATATTCTTAAA	123322
Cas13	184	GAGTTCCTAGGAAATTTTCATGCAGGAAATATCCTGTTCAAAGTGAAGGGCAAAGAAGGG	243
Sbjct	123323	GAATTTACAAGAAAATTTTCATGCAGGAAATATTCTATTTAAGTTGAAAGGTAAAGAAGGA	123382
Cas13	244	ATCATTAGAATTGAGAATAACGACGACTTCCTGGAGACAGAGGAAGTGGTGCTGTATATC	303
Sbjct	123383	ATCATAAGAATAGAAAATAATGATGATTTTTTGGAAACAGAAGAAGTTGTATTATATATA	123442
Cas13	304	GAGGCCTACGGCAAGAGCGAGAAGCTGAAAGCACTGGGGATCACAAGAAAAAGATCATT	363
Sbjct	123443	GAAGCATATGGAAAATCTGAGAAATTGAAAGCATTGGGGATTACAAAAAGAAAAATAA	123502
Cas13	364	GACGAGGCCATCAGGCAGGGCATTACTAAGGACGATAAAAAGATCGAGATCAAGCGACAG	423
Sbjct	123503	GATGAAGCAATTAGGCAAGGAATAACTAAAGATGATAAAAAAATAGAAATAAGAGACAA	123562
Cas13	424	GAGAACGAGGAAGAGATCGAAATTGACATCCGGGATGAGTACACTAATAAGACCCTGAAC	483
Sbjct	123563	GAGAATGAAGAAGAAATAGAGATAGATATCAGAGATGAGTATACTAATAAAACACTAAAT	123622

Cas13	421	CAGGAGAACGAGGAAGAGATCGAAATTGACATCCGGGATGAGTACACTAATAAGACCOCTG	488
Sbjct	445	CAGGAGAACGAGGAAGAGATCGAAATTGACATCCGGGATGAGTACACTAATAAGACCOCTG	504
Cas13	481	AACGACTGCTCCATCATTCTGCGCATCATTGAAAACGATGAACTGGAGACAAAGAGAGGC	548
Sbjct	505	AACGACTGCTCCATCATTCTGCGCATCATTGAAAACGATGAACTGGAGACAAAGAGAGGC	564
Cas13	541	ATCTACGAGATCTTCAAGAACATCAATATGAGCCTGTATAAGATCATCGAGAAGATCATC	608
Sbjct	565	ATCTACGAGATCTTCAAGAACATCAATATGAGCCTGTATAAGATCATCGAGAAGATCATC	624
Cas13	601	GAAAACGAGACAGAAAAGGTGTTTGAAAATAGATACTACGAAGAGCACCTGAGGGAGAAAG	668
Sbjct	625	GAAAACGAGACAGAAAAGGTGTTTGAAAATAGATACTACGAAGAGCACCTGAGGGAGAAAG	684
Cas13	661	CTGCTGAAAGACGATAAG	678
Sbjct	685	CTGCTGAAAGACGATAAG	702

Alineamiento de la secuencia NOS utilizada en la construcción de la plataforma con el genoma de *Agrobacterium radiobacter*

NOS	7	CCGATGACGCGGGACAAGCCGTTTTACGTTTGGAAGTACAGAACCGCAACGTTGAAGGA	66
Sbjct	45094	CCGATGACGCGGGACAAGCCGTTTTACGTTTGGAAGTACAGAACCGCAACGTTGAAGGA	45035
NOS	67	GCCACTCAGCCGCGGGTTTCTGGAGTTTAATGAGCTAAGCACATACGTCAGAAACCATTA	126
Sbjct	45034	GCCACTCAGCCGCGGGTTTCTGGAGTTTAATGAGCTAAGCACATACGTCAGAAACCATTA	44975
NOS	127	TTGCGCGTTCAAAAGTCGCCTAAGGTCATATCAGCTAGCAAATATTTCTTGTCAAAAAT	186
Sbjct	44974	TTGCGCGTTCAAAAGTCGCCTAAGGTCATATCAGCTAGCAAATATTTCTTGTCAAAAAT	44915
NOS	187	GCTCCACTGACGTTCCATAAATCCCTCGGTATCCAATTAGAGTCTCATATTCCTCTC	246
Sbjct	44914	GCTCCACTGACGTTCCATAAATCCCTCGGTATCCAATTAGAGTCTCATATTCCTCTC	44855
NOS	247	AATCCAAATAATCTGCA	263
Sbjct	44854	AATCCAAATAATCTGCA	44838