



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la
Agrodiversidad Valenciana

Avanzando hacia la edición genética CRISPR-Cas en
lechuga mediante vectores virales

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Vegetal

AUTOR/A: Cano Sales, Lucía

Tutor/a: López Del Rincón, Carmelo

Cotutor/a externo: DAROS ARNAU, JOSE ANTONIO

Director/a Experimental: GARCIA PEREZ, ARCADIO

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la
Agrodiversidad Valenciana



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrodiversidad Valenciana



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Avanzando hacia la edición genética CRISPR-Cas en lechuga mediante vectores virales

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejor Genética Vegetal

Autora: Cano Sales, Lucía

Tutor: López Del Rincón, Carmelo

Cotutor externo: Daròs Arnau, José Antonio

Director experimental: García Pérez, Arcadio

Valencia, septiembre 2023

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a José Antonio por permitirme formar parte durante estos meses del laboratorio y por la ayuda durante la escritura de esta memoria.

A Arcadio por su paciencia y por guiarme durante todo este trabajo, tanto en lo experimental como durante la escritura. Durante estos meses he aprendido mucho y siempre te lo agradeceré.

Agradecer también a todos los compañeros de laboratorio: Diego, Enrique, Fernando, María, Marie y Vero, gracias por ayudarme en lo que habéis podido, pero sobre todo por todas las conversaciones amenas, los almuerzos que no han sido pocos y por ser tan maravillosos.

A toda La Placeta, gracias por vuestro apoyo cuando más lo necesito, por sacarme mil sonrisas y por todas las fiestas que nos montamos, pero sobre todo por dejarme formar parte de esta gran familia yatovera. Gracias por ser mi segunda familia.

Finalmente, a mi familia, agradecerle por soportarme estos años y saber gestionar mis continuos cambios de humor. Papá y mamá gracias por no ponerme nunca barreras a lo que quiero hacer, soy lo que soy gracias a vosotros. Y Jesús, gracias por ser el mejor/peor hermano que hay, por ser probablemente con la persona que más discuto, pero también con la que mejor me lo paso. Mil gracias familia.

Índice

1. Resumen / Abstract / Resum.....	1
2. Introducción	4
2.1. Mejora genética de plantas	4
2.2. Sistema CRISPR/Cas	5
2.3. Métodos de transformación de plantas	8
2.4. Virus X de la lechuga	9
3. Objetivos.....	11
4. Materiales y métodos	12
4.1. Transformación genética de lechugas	12
4.1.1. Material vegetal	12
4.1.2. Esterilización semillas	12
4.1.3. Germinación semillas y obtención plantas axénicas.....	12
4.1.4. Medios de cultivo.....	12
4.1.5. Obtención y precultivo de explantes	13
4.1.6. Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
4.1.7. Selección y regeneración de plantas transgénicas.....	13
4.2. Construcción del vector viral	14
4.2.1. Amplificación de DNA de interés mediante PCR	14
4.2.2. Electroforesis en gel de agarosa.....	15
4.2.3. Elución de ácidos nucleicos de geles de agarosa	15
4.2.4. Digestión y ensamblaje de plásmidos	15
4.2.5. Purificación ácidos nucleicos de una solución líquida	16
4.2.6. Electroporación de <i>Escherichia coli</i>	16
4.2.7. Picado de colonias y minipreparación de los plásmidos.....	16
4.2.8. Secuenciación de plásmidos	17
4.2.9. Electroporación de <i>A. tumefaciens</i>	17
4.2.10. Agroinfiltración de plantas	17
4.2.11. Extracción de RNA de plantas infectadas	18
4.2.12. Retrotranscripción (RT) de RNA y amplificación de cDNA mediante PCR	18
4.2.13. Cultivo de las plantas en el invernadero	19
5. Resultados y discusión.....	20
5.1. Transformación genética de lechugas	20
5.2. Construcción del vector viral	22
6. Conclusiones	30
7. Bibliografía.....	31

1. Resumen / Abstract / Resum

Resumen

La edición genética CRISPR-Cas ha abierto oportunidades sin precedentes en biotecnología de plantas. Para conseguir edición genética CRISPR-Cas en plantas es necesario expresar dos componentes de la reacción, una nucleasa Cas que cortará el DNA genómico y su RNA guía que la dirigirá a una determinada posición en el genoma. En plantas, debido a la presencia de pared celular, la expresión de estos dos elementos no es trivial y habitualmente requiere la transformación genética estable. Como alternativa, se puede aprovechar la capacidad replicativa y de movimiento sistémico de los vectores virales. El objetivo de este trabajo de fin de máster ha sido la obtención de algunas herramientas biotecnológicas que faciliten la edición genética CRISPR-Cas en una especie de particular interés agronómico como es la lechuga. Por un lado, se ha tratado de transformar lechuga para expresar Cas9 de forma estable y, por otro, se ha desarrollado un vector de expresión de RNAs guía derivado del virus X de la lechuga.

Palabras clave: edición genética, CRISPR-Cas, lechuga, vector viral

Abstract

CRISPR-Cas gene editing has opened up unprecedented opportunities in plant biotechnology. To achieve CRISPR-Cas gene editing in plants it is necessary to express two components of the reaction, a Cas nuclease that will cut the genomic DNA and its guide RNA that will direct it to a certain position in the genome. In plants, due to the presence of the cell wall, the expression of these two elements is not trivial and usually requires stable genetic transformation. Alternatively, the replicative and systemic movement capacity of viral vectors can be exploited. The aim of this master thesis has been to obtain some biotechnological tools to facilitate CRISPR-Cas gene editing in a species of particular agronomic interest such as lettuce. On the one hand, we have tried to transform lettuce to stably express Cas9 and, on the other hand, we have developed a vector for the expression of guide RNAs derived from lettuce virus X.

Keywords: gene editing, CRISPR-Cas, lettuce, viral vector

Resum

L'edició genètica CRISPR-Cas ha obert oportunitats sense precedents en biotecnologia de plantes. Per a aconseguir edició genètica CRISPR-Cas en plantes es necessari expressar dos components de la reacció, una nucleasa Cas que tallarà el DNA genòmic i el seu RNA guia que la dirigirà a una determinada posició en el genoma. En plantes, degut a la presència de paret cel·lular, l'expressió d'aquests dos elements no és trivial i habitualment requereix la transformació genètica estable. Com alternativa, es pot aprofitar la capacitat replicativa i de moviment sistèmic dels vectors virals. L'objectiu d'aquest treball de fi de màster ha sigut l'obtenció d'algunes eines biotecnològiques que faciliten l'edició genètica CRISPR-Cas en una espècie de particular interès agronòmic com és l'encisam. D'una banda, s'ha tractat de transformar encisam per a expressar Cas9 de manera estable y, per l'altra, s'ha desenvolupat un vector d'expressió d'RNAs guia derivat del virus X de l'encisam.

Paraules clau: edició genètica, CRISPR-Cas, encisam, vector viral

2. Introducción

2.1. Mejora genética de plantas

A lo largo de la historia de la humanidad, el ser humano ha persistido en la búsqueda de mejorar las plantas con el fin de lograr una mayor calidad nutricional, mayores rendimientos agrícolas o resistencia a los distintos factores tanto ambientales como biológicos. Al inicio de la agricultura, la mejora de los cultivos se realizaba de forma instintiva, se seleccionaban aquellas plantas que se consideraba que daban los mejores frutos, ya sea por su apariencia, producción o supervivencia, y se sembraban sus semillas. De esta manera poco a poco se fueron domesticando las plantas hasta los cultivos que conocemos hoy en día.

Con los años, la mejora de los cultivos se comenzó a hacer de forma consciente para llegar a obtener plantas con unos requerimientos específicos. Para ello se comenzaron a emplear técnicas convencionales de mejora basadas en seleccionar aquellas variaciones genéticas naturales o inducidas, que resultaban interesantes, y mediante cruces y selección en la descendencia introducirla en aquellos cultivos que se deseaba (Mohanta et al., 2017). A pesar de tratarse de un buen sistema de mejora que sigue empleándose hoy en día, presenta varias limitaciones como su poca especificidad, ya que realmente no podemos seleccionar la región del genoma que se va a transferir de una planta a otra, ni donde se va a producir dicha transferencia, pero, sobre todo, presenta la limitación del tiempo. Se requieren varias generaciones para conseguir mejorar los cultivos (Hartung & Schiemann, 2014).

Cada año la población mundial va aumentando más y más, y está surgiendo la necesidad de conseguir más rendimiento en los cultivos para conseguir satisfacer a toda la población, en un futuro no tan lejano. Por ello, son necesarias técnicas que nos ayuden a mejorar las plantas de forma más rápida y eficiente que los métodos que se empleaban hasta ahora (Priyadarshan, 2019). Con el avance de la ciencia, se han desarrollado diversas técnicas de edición genética que nos permiten modificar de forma más precisa el genoma empleando endonucleasas específicas de secuencia. Las cuatro principales técnicas que podemos encontrar en la edición genómica en función de la endonucleasa son: las meganucleasas, las nucleasas de dedos de zinc (ZFN; *zinc-fingers nucleases*), las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALENs; *transcription activator-like effector nuclease*) y el sistema CRISPR/Cas (Kaur et al., 2022). Estas técnicas están basadas en el empleo de "tijeras moleculares" (endonucleasas) que cortan el ADN en el sitio específico, dando lugar a que la célula repare el ADN roto mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ; non-homologous DNA end joining) o mediante reparación por homología (HDR; *homology-directed repair*), tratándose de técnicas de gran interés ya que permiten dirigir la mutación a un lugar concreto del genoma (Van Vu et al., 2022).

Las meganucleasas fueron las primeras herramientas de edición genómica empleadas. Son endonucleasas naturales capaces de reconocer grandes secuencias de ADN (entre 12 y 40 pares de bases (pb)). Sin embargo, su principal inconveniente es la cantidad de tiempo que requiere diseñar una secuencia de reconocimiento de gran tamaño, por ello, rara vez se emplea en comparación con las otras herramientas genómicas (Puchta & Fauser, 2013).

A continuación, encontramos las ZFN compuestas por dos dominios. Por un lado, una matriz en tándem de dedos de zinc que son capaces de unirse al DNA y reconocer aproximadamente 3 pb y, por otro lado, una nucleasa FokI no específica. Al igual que las meganucleasas, su diseño es costoso y junto con su poca especificidad y la alta tasa de mutaciones hacen que su aplicabilidad sea limitada (Urnov et al., 2010).

Como alternativa surgen las TALEN, compuestas por un conjunto de proteínas TALE capaces de unirse al DNA. Estas proteínas se encuentran fusionadas a un dominio de nucleasa FokI. Dado a que cada proteína TALE es capaz de reconocer un solo nucleótido, es un sistema mucho más preciso que los dos mencionados con anterioridad, pero diseñar una matriz de TALE diferente para cada diana nucleotídica requiere un trabajo costoso siendo este su principal inconveniente (Joung & Sander, 2012).

Comparando estas técnicas de edición genética con las convencionales, podemos modificar el genoma de las plantas de forma mucho más rápida, versátil y específica. Sin embargo, estas técnicas tampoco son perfectas, presentan diversas desventajas, ya que se pueden producir cortes de manera no específica en regiones del genoma que no deseamos. Asimismo, se trata de herramientas difíciles de diseñar y costosas (Gupta & Musunuru, 2014).

2.2. Sistema CRISPR/Cas

Las técnicas basadas en CRISPR/Cas se desarrollaron en el año 2012, aunque los descubrimientos científicos en las que están basadas se retrotraen a la década de 1980. Se emplean como poderosas herramientas de edición genética gracias a su simplicidad y versatilidad, ya que, a diferencia de las herramientas comentadas anteriormente, el sistema CRISPR/Cas es guiado por un RNA personalizable (*single guide RNA*, sgRNA), por lo que no es necesario diseñar una nueva proteína para cada ADN diana. Gracias a ello, se ha vuelto una herramienta líder para la mutagénesis dirigida (Huang et al., 2022).

La tecnología se basa en las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) y proteínas asociadas a CRISPR (Cas). CRISPR, junto con las proteínas Cas, forman un sistema de inmunidad adaptativa propia de las bacterias y las arqueas frente a fagos (Bhatia et al., 2013). El sistema previene de la infección almacenando ADN viral que ha atacado a la bacteria, de manera que estos fragmentos serán utilizados para reconocer el ADN extraño en futuros ataques degradándolo para protegerse, convirtiéndose así en un banco de memoria de las distintas invasiones que ha sufrido la bacteria huésped (Nidhi et al., 2021 y Van Beljouw et al., 2022).

Cada vez que se produce la entrada de ADN extraño en una bacteria, se activa el mecanismo CRISPR/Cas, y la bacteria degrada el ADN invasor en tres fases: adaptación, biogénesis e inmunidad (**Figura 1**). En la primera fase, la adaptación, la matriz CRISPR de la bacteria huésped adquiere un fragmento del ADN invasor que posteriormente durante la fase de biogénesis se transcribe como ARN maduro (*CRISPR RNA*, crRNA). Serán estos crRNA los que la enzima nucleasa Cas empleará como guía para degradar el ADN extraño durante la fase de inmunidad. Para que se produzca la acción de la endonucleasa Cas, es necesario que en la secuencia de ADN esté presente una secuencia corta conocida como motivo adyacente al protoespaciador (PAM; *protospacer adjacent motif*) aguas abajo del sitio diana (Kaur et al., 2022).

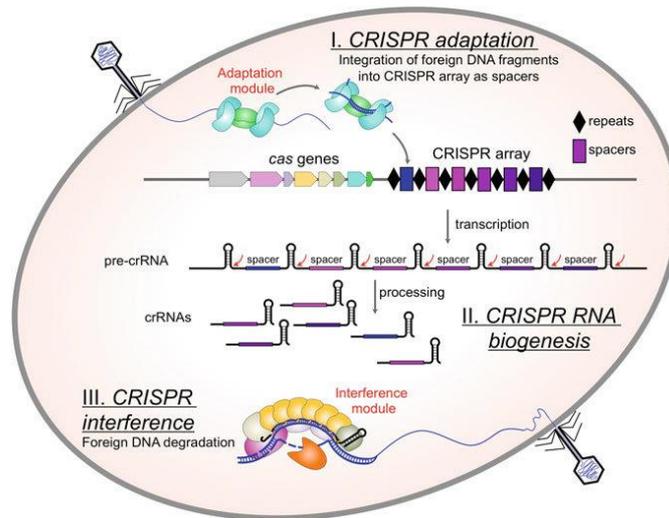


Figura 1. Fases de la inmunidad adaptativa del sistema CRISPR/Cas (Semenova & Severinov, 2017).

En función de las características de las proteínas Cas en cuanto a su secuencia, estructura y función, los sistemas CRISPR/Cas se distinguen en dos clases: la clase 1 y la clase 2, que a su vez están divididos en tipos. Los sistemas de clase 1, emplean más de una proteína efectora. En esta clase podemos encontrar los sistemas tipo I, III y IV. Por otro lado, en los sistemas clase 2, solo es necesario una proteína efectora para que se produzca la escisión. Dentro de esta clase encontramos los sistemas tipo II, V y VI (Cao et al., 2020). Son los sistemas CRISPR/Cas clase 2 los más adoptados y utilizados en el campo de la biotecnología, entre los más utilizados se encuentran el tipo II Cas9 y el tipo V Cas12a (**Figura 2**). Ambos sistemas presentan sus propias características, como las diferencias entre los motivos PAM, el tamaño de la proteína Cas o los sitios de corte de cada enzima (Liu et al., 2020b). En la actualidad, la mayoría de las investigaciones se han centrado en el tipo II Cas9 adoptado de la bacteria *Streptococcus pyogenes* (Li et al., 2017).

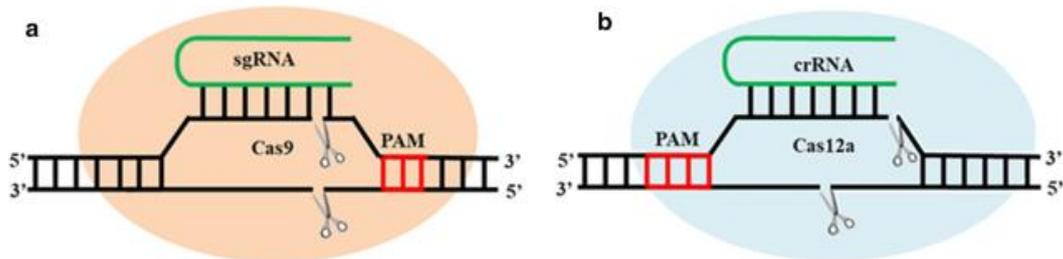


Figura 2. Mecanismos de los diferentes tipos de sistemas CRISPR. (a) Sistema tipo II Cas9. (b) Sistema tipo V Cas12a (Liu et al., 2020b).

El sistema CRISPR/Cas9 está compuesto por crRNA, ARN CRISPR transactivador (tracrRNA) y la nucleasa Cas9. Al detectar la entrada de ADN invasor, el sistema CRISPR/Cas9 se activará y cortará el ADN extraño mediante la nucleasa Cas9 y el ARN guía (sgRNA) que surge de la combinación entre crRNA y tracrRNA. La nucleasa Cas9 tiene dos dominios, el dominio HNH que corta la cadena complementaria al sgRNA, y el dominio RuvC que corta la cadena opuesta (**Figura 3**). El sgRNA con una longitud de aproximadamente 100 nucleótidos (nt), presenta en el extremo 5' una secuencia de 20

nt que actuará como guía para identificar la secuencia diana que irá acompañada del motivo PAM (para el caso de Cas9 será 5'-NGG-3'), mientras que en el extremo 3' presenta una estructura de bucle para formar un complejo con Cas9 y romper la doble cadena en el sitio diana. Una vez se ha realizado el corte de la doble cadena, comienza el mecanismo de reparación, que como se ha comentado con anterioridad puede realizarse mediante NHEJ o mediante HDR. La reparación mediante NHEJ genera mutaciones de inactivación de genes, mientras que, si se repara mediante HDR con una plantilla presente, se pueden conseguir reemplazar genes o activarlos. Gracias a esta reparación, se puede insertar o eliminar genes de forma simple convirtiendo así al sistema CRISPR/Cas9 en una manera eficiente de editar el genoma de diversos organismos entre los que podemos incluir plantas, animales e incluso humanos (Koonim & Makarova, 2019).

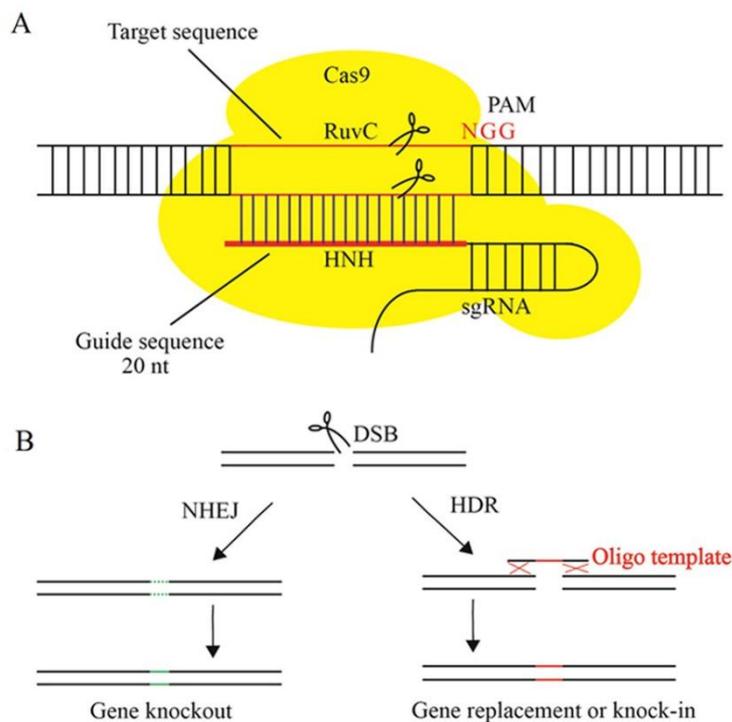


Figura 3. Edición mediante sistema CRISPR/Cas9. (A) Esquema del sistema CRISPR/Cas9. (B) Formas de reparar la rotura de la doble cadena (Koonim & Makarova, 2019).

La introducción del sistema CRISPR/Cas en plantas puede suponer un gran avance en la mejora de la agricultura. Gracias a su capacidad para manipular el genoma con gran precisión, ya sea eliminando rasgos que son considerados no deseados o introduciendo mutaciones que pueden ser beneficiosas, se está consiguiendo mejorar no solo características en los cultivos como puede ser el aumento de rendimiento, la calidad del cultivo o la resistencia a distintas enfermedades, si no que su combinación con los métodos de reproducción convencionales ha supuesto un gran avance en la producción agrícola. Su capacidad para dirigirse a genes relacionados con la reproducción y obtener líneas de mejora como pueden ser líneas haploides, líneas androestériles o manipulando la autoincompatibilidad, ha supuesto que, lo que mediante mejora convencional se conseguía a lo largo de muchas generaciones, ahora gracias al uso conjunto con CRISPR/Cas se consigue en unas pocas, ahorrando así no solo mucho

tiempo para la mejora de plantas, si no que haciéndolo de forma mucho más eficiente (Zhu et al., 2020).

2.3. Métodos de transformación de plantas

Estos sistemas no los encontramos de manera natural en las plantas, es necesario transferir el material genético exógeno empleando distintos métodos. Podemos encontrar métodos físicos y métodos químicos para realizar la transferencia de genes de interés. Los tres métodos principales para conseguir este objetivo son: la transferencia mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, la biobalística y el empleo de virus como vectores virales (Atiq, 2019).

El primer método y el más empleado es el mediado por *A. tumefaciens*, bacteria del suelo que es capaz de causar tumores en las plantas. Dichos tumores están asociados con un plásmido inductor de tumores (Ti). Dentro de este plásmido, se identificó una región conocida como ADN de transferencia (T-DNA) capaz de integrarse en el genoma de la planta. Tras la infección, el plásmido Ti induce la formación de agallas en la región del tallo de la planta huésped y comienza la transferencia del T-DNA desde el plásmido Ti hasta el genoma nuclear de la planta de forma estable. Gracias a las tecnologías actuales, es posible modificar el T-DNA para llevar un gen exógeno a elección y así expresar la proteína de interés (Ramkumar et al., 2020). Para emplear este método, es necesario regenerar plantas mediante cultivo *in vitro*, proceso en el cual se forman nuevos órganos y tejidos a partir de la transformación de explantes. Dicha regeneración se puede realizar mediante organogénesis o embriogénesis somática (Bidabadi & Jain, 2020). Pese a tratarse de un buen sistema de transformación, también es necesario conocer que presenta ciertas limitaciones como el largo proceso de regeneración de las plantas a través del cultivo de tejidos *in vitro* o las posibles variaciones somaclonales no deseadas en las células regeneradas (Kujur et al., 2021).

El siguiente método ampliamente utilizado en la transformación de plantas es la biobalística, que consiste en bombardear micropartículas recubiertas de DNA. Dichas micropartículas son capaces de atravesar la pared celular y así permitir la transferencia de genes y su expresión en las células de forma transitoria (Lacroix & Citovsky, 2020).

El último método es el empleo de virus para que actúen como vectores, de manera que se consiguen manipular los virus para que expresen genes de interés en las plantas de manera transitoria; se consigue que un determinado gen se exprese durante un corto período de tiempo en la planta (Oh et al., 2021). A diferencia de otros sistemas de transformación, con los vectores virales se pueden obtener las proteínas de interés de forma más rápida y eficiente que con otros sistemas gracias a la capacidad replicativa de los propios virus. Este método presenta ciertas limitaciones como el tamaño de la inserción que son capaces de expresar, tamaños muy grandes de DNA insertado no se expresan de manera efectiva en la planta (Gleba et al., 2007).

Existen diversas aplicaciones del empleo de virus como vectores. Por un lado, encontramos la edición del genoma inducida por virus (*virus-induced gene editing*, VIGE) que permite la posibilidad de diseñar un virus que sea capaz de expresar proteínas Cas y sgRNA manteniendo la infectividad de éste, de manera que pueda propagarse por toda la planta (Oh et al., 2021b y Uranga & Daròs, 2022). Por otro lado, encontramos el silenciamiento de genes de la planta huésped (*virus-induced gene silencing*, VIGS),

ampliamente utilizado para estudiar la función de los genes de las plantas (Yin et al., 2015)

2.4. Virus X de la lechuga

El virus X de la lechuga (*lettuce virus X*, LeVX) es un virus vegetal perteneciente al género *Potexvirus*. Los virus pertenecientes a este género causan síntomas de mosaicos cloróticos o síntomas de moteados. A diferencia de muchos otros virus, los potexvirus se transmiten por contacto mecánico (Genus: Potexvirus | ICTV, s. f.). La primera vez que se identificó el LeVX fue en 2005 en Irán, siendo el primer potexvirus que se ha conseguido aislar en lechuga (Dizadji et al., 2008b).

La distribución geográfica del LeVX se encuentra restringida a aquellos lugares en los que se cultiven sus huéspedes. Es capaz de infectar plantas dicotiledóneas; entre los cultivos que es capaz de infectar podemos encontrar algunos de gran importancia económica como: lechugas (*Lactuca sativa*), espinacas (*Spinacia oleracea*) y alubias (*Phaseolus vulgaris*). En las plantas de lechuga se ha observado que el virus no muestra síntomas, permanecen asintomáticas tras la infección, por lo que se ha podido pasar por alto su presencia en el cultivo. En cambio, en otras especies, se pueden observar síntomas tales como enrollamiento hacia debajo de las hojas, lesiones cloróticas, mosaico, moteado, lesiones necróticas y coloración amarillenta leve en los nervios de las hojas (Dizadji et al., 2008b).

En cuanto a la estructura del virus, se ha observado por microscopía electrónica (**Figura 4**) que forma partículas virales en forma de varilla larga con una longitud de barra igual a 100 nm, contiene RNA monocatenario positivo de aproximadamente 7.2 kb.



Figura 4. Imagen de LeVX tomada por microscopía electrónica (Dizadji et al., 2008b).

El material genético del virus consiste en ssRNA (+) de cadena simple (**Figura 5**), el cual contiene cinco marcos de lectura abiertos (*open reading frame*, ORF). La primera ORF codifica una proteína implicada en la replicación del virus de aproximadamente 192 kDa, la RNA polimerasa RNA dependiente (*RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp). Aguas debajo de esta primera ORF, podemos encontrar los tres siguientes ORFs (ORF₂₋₄) formando un bloque triple de genes (*triple gene block*, TGB). Los productos codificados

en el TGB están implicados en el movimiento viral de célula a célula y son denominados TGB1, TGB2 y TGB3 (25.5, 12.4 y 9 kDa, respectivamente). Por último, la quinta ORF, codifica una proteína de cubierta (CP) de 26 kDa. El extremo 5' comienza con una región no codificante poco común entre los potexvirus (5'-GGAAAA), este motivo es importante para la replicación del RNA viral. En el extremo 3' encontramos una cola de poliadeninas (Van Der Vlugt & Berendsen, 2002 y Dizadji et al., 2008b).



Figura 5. Representación esquemática del genoma de LeVX (Dizadji et al., 2008b).

3. Objetivos

1. Transformación genética de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) para expresar constitutivamente SpCas9.
2. Construcción de un vector viral derivado de un asilado de LeVX para la expresión de sgRNAs para edición genética CRISPR-Cas en lechuga.
3. Evaluación de la capacidad infectiva del vector en plantas modelo de *Nicotiana benthamiana*.
4. Evaluación de la infectividad del vector en cultivares comerciales de lechuga.

4. Materiales y métodos

4.1. Transformación genética de lechugas

4.1.1. Material vegetal

El material vegetal empleado para la realización de este trabajo son semillas de lechuga (*Lactuca Sativa* L.) comerciales de los cultivares Romana Reina Mayo y Trocadero Mantecosa.

4.1.2. Esterilización semillas

Es necesario esterilizar las semillas para obtener plántulas axénicas. Para ello, se introdujeron las semillas en sobres de papel de filtro previamente esterilizado y, posteriormente, se sumergieron en una solución de lejía comercial al 12% durante 15 min. A continuación, para eliminar la solución desinfectante, se realizaron cuatro lavados consecutivos con agua Milli-Q estéril durante 5 min cada uno de ellos.

4.1.3. Germinación semillas y obtención plantas axénicas

Las semillas estériles, se sembraron en placas Petri que contenían medio de germinación (MG) (n = 24 semillas por placa). Este medio está compuesto por 2,2 g/L de Sales MS vitaminadas (Murashige & Skoog), 10 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar agar BAC, pH 5,8. Se adicionó al medio 1 mL/L de benomilo para evitar posibles contaminación de hongos. Las placas se sellaron con esparadrapo de papel (*Micropore*). La germinación de las semillas se dio en cámaras de cultivo en condiciones de fotoperiodo (16 h luz) y temperatura (25 °C) controladas.

Las semillas se dejaron en este medio hasta los 11 días, período en el que estas habían germinado y se encontraban en un estado de desarrollo suficiente para poder obtener explantes de cotiledón y de hoja que se emplearon en la transformación.

4.1.4. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo que se han empleado durante la realización de este trabajo están compuestos por un medio base (MB) compuesto por 4,3 g/L de Sales MS vitaminadas (Murashige & Skoog), 30 g/L de sacarosa, 8 g/L agar agar BAC, pH 5.8. A este medio se le adicionó 1 mL/L de benomilo para evitar la contaminación por hongos durante el experimento, 500 mg/L de polivinilpirrolidona (PVP) para evitar oxidaciones tanto de los explantes como del medio de cultivo. En función de qué deseábamos conseguir, se le adicionaron distintos reguladores de crecimiento a cada uno de los medios que son los que se describen a continuación:

a) Medio de precultivo:

Medio utilizado para favorecer desarrollo de los explantes y su supervivencia durante la realización del experimento. Para ello, se adicionó al MB 0.04 mg/L de ácido naftalenacético (NAA) y 0.5 mg/L de 6-bencil aminopurina (6-BAP).

b) Medio de cocultivo:

Medio empleado para permitir el cultivo de los explantes junto a la cepa de *A. tumefaciens* que contiene el gen de interés. Al MB se le adicionó 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 2 mL/L de acetosiringona.

c) Medio de organogénesis:

Se empleó para la formación de callos organogénicos a partir de los explantes. Para ello, al MB se le adicionaron 0.04 mg/L de NAA, 0.5 mg/L de 6-BAP, 10 mg/L de higromicina como agente selectivo y 3 mg/L de timentina para inhibir el crecimiento de *A. tumefaciens*.

Una vez elaborado el MB, se autoclavó durante 30 min a 121 °C. Tras ello, se dejaron enfriar y se le adicionaron los distintos reguladores de crecimiento en función del medio que necesitáramos antes de que solidificaran. A continuación, se distribuyeron en placas Petri que se dejaron solidificar y se guardaron a 4 °C hasta su uso.

4.1.5. Obtención y precultivo de explantes

Transcurridos 11 días se obtuvieron los explantes de cotiledón y de hoja de las plántulas axénicas que se habían dejado germinando. En el caso de los cotiledones, se eliminaron los extremos basal y apical únicamente. En el caso de las hojas, además, se dividieron en dos obteniendo así 2 explantes por hoja.

Una vez obtenidos los explantes de cotiledón y hoja, se transfirieron a placas de Petri que contenían medio de precultivo (descrito en el apartado 4.1.4). Los explantes se cultivan con el envés en contacto con el medio. Se cultivaron durante dos días en cultivo de noche en condiciones de temperatura y humedad controladas indicadas en el apartado 4.1.3.

4.1.6. Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación de los explantes de lechuga, se empleó una cepa de *A. tumefaciens* en la que se encontraba el plásmido pLBHigCas9 que contenía la secuencia codificante de la proteína SpCas9, obtenida con anterioridad en el laboratorio. Dicha cepa se encontraba glicerizada en un congelador a -80 °C para asegurar su correcto mantenimiento.

Se cultivó la cepa *A. tumefaciens* con el plásmido de interés en medio sólido LB suplementado con los antibióticos adecuados para la correcta selección de las colonias durante 48 h a 28 °C. Transcurrido ese tiempo, se picaron las colonias de tamaño intermedio con un palillo estéril en un ambiente estéril por llama y, se transfirieron a tubos de ensayo de 10 mL que contenían medio líquido de LB junto con los antibióticos adecuados. Se dejaron creciendo los cultivos durante 1 día a 28 °C en agitación constante. Tras ello, se pasaron parte de dichos cultivos crecidos (400 µL) a matraces que contenían 50 mL de medio MB líquido (sin agar), a los que se le adicionó acetosiringona a 150 µL. Se taparon los matraces con papel de aluminio y se incubaron durante 1 día a 28 °C en agitación constante.

4.1.7. Selección y regeneración de plantas transgénicas

Los explantes cultivados se sumergieron durante 15 min en el cultivo de *A. tumefaciens* en agitación manual cada 30 s aproximadamente. Tras la inoculación, se transfirieron los explantes sin secar a placas de Petri que contenían medio de cocultivo con el envés de los explantes en contacto con el medio. Se llevaron a cultivar los explantes junto con las bacterias durante 48 h a 28 °C en oscuridad en condiciones de humedad y temperatura controladas (descritas en el apartado 4.1.3).

Tras el cultivo conjunto de los explantes y las bacterias es necesario eliminar el exceso de éstas últimas. Para ello, se transfirieron los explantes a medio de lavado donde se dejaron durante 15 min en agitación manual. El medio de lavado estaba compuesto por MB líquido suplementado con 500 mg/L de cefotaxima para eliminar el exceso de *A.*

tumefaciens. A continuación, los explantes se secaron bien con papel de filtro previamente estéril y se transfirieron a placas de Petri con el envés en contacto con el medio de organogénesis. Los explantes se cultivaron en una cámara de cultivo con las condiciones descritas en el apartado 4.1.3 donde se dio lugar la formación de callos en las zonas donde se han realizado los cortes en los explantes. Se realizaron diversas transferencias de los explantes al mismo medio de organogénesis fresco cada 10-15 días, para conseguir que a partir de los callos formados se desarrollaran yemas y brotes.

4.2. Construcción del vector viral

4.2.1. Amplificación de DNA de interés mediante PCR

Las amplificaciones de DNA se realizaron mediante PCR empleando la DNA polimerasa de alta fidelidad *Phusion* (Thermo Scientific), que presenta una baja tasa de error (4.4×10^{-7}). Con el fin de evitar contaminación durante la realización de la PCR se emplearon puntas con filtro. Además, durante el montaje de la reacción se trabajó en todo momento en hielo. Cada reacción de PCR constaba de: 4 μ L de tampón HF (Thermo Scientific), 0.6 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO), 0.4 μ L de dNTPs (10 mM), 0.4 μ L de cebador directo (25 μ M), 0.4 μ L de cebador reverso (25 μ M), 0.2 μ L de DNA polimerasa *Phusion* (2 U/ μ L), 0.2 μ L de DNA molde y agua milli-Q hasta llegar a 20 μ L. Las PCR se llevaron a cabo en un termociclador con las condiciones que se muestran en la tabla 1. La secuencia de los cebadores y su utilidad en el trabajo se muestran en la tabla 2.

Tabla 1. Condiciones del termociclador empleado en las reacciones de PCR.

Proceso		Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial		30 s	98 °C
Desnaturalización	x30 ciclos	10 s	98 °C
Hibridación		30 s	55 °C
Extensión		15 s/ 1 kb producto	72 °C
Extensión final		10 min	72 °C

Tabla 2. Cebadores empleados durante el trabajo junto con su utilidad en el mismo.

Código cebador	Secuencia	Uso
D5107	5'-AGAAAGGCGTAAGTGGAACA-3'	Retrotranscripción de RNA de tejido infectado a cDNA
D5347	5'-GTGGTCTCGATGTCGCCCCCTGGAA-3'	Amplificación del cDNA del sgRNA
D5348	5'-CCCGGCCAAATCACAAACTCGGC-3'	

D5457	5'- AGGGGAACCCCAAGCTGACATCGACGTATAAAATCCCGGT TTTAGAGCTAGAA-3'	Amplificación del sgRNA del plásmido pPVX:sgxT2B
D5458	5'-GTGGCACCGAGTCGGTGCTAGGGTTTGTAAAGTTTCCC-3'	

4.2.2. Electroforesis en gel de agarosa

Se prepararon geles de agarosa (8 x 6.5 x 0.5 cm) vertiendo 25 mL de agarosa al 1% o al 2%, dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA a analizar, fundida en tampón de electroforesis TAE (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM acetato de sodio), se colocó un peine con el número de pocillos que se deseaba y se dejó enfriar durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, se retiró el peine y se sumergió el gel en una cubeta de electroforesis que contenía TAE. Se introdujeron las muestras en los distintos pocillos una vez se habían mezclado con una cantidad proporcional (1:10) de tampón de carga (x10) (12.5 mg de azul de bromofenol, 12.5 mg de xilencianol, 28.75 g de glicerol al 87%, 1 mL de EDTA 0.5 M, pH 8.0). Se añadió un marcador molecular en uno de los pocillos libres del gel de 1 kb o 100 pb en función del tamaño del DNA. Una vez cargadas todas las muestras, se corrió el gel de electroforesis durante 35 min a 85 V.

Se tiñeron los geles en una cubeta de plástico que contenía 200 mL de agua milli-Q y 10 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL), la cubeta se mantenía en agitación constante (125 rpm) durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, los geles se lavaban con agua tres veces consecutivas con el fin de eliminar todo lo posible el bromuro de etidio, y se visualizaban en el transiluminador (Uvitec).

4.2.3. Elución de ácidos nucleicos de geles de agarosa

Para eluir el DNA que se había separado en el gel de agarosa, se empleó el kit de columnas ZYMO Research. Para ello, se cortaron las bandas (intentando realizar los cortes lo más precisos posibles) y se introdujeron en tubos Eppendorf de 1.5 mL. A continuación, se añadieron 3 volúmenes de tampón de disolución de agarosa (*agarose dissolving buffer*, ADB) para los geles al 1% de agarosa y, 4.5 volúmenes a los geles al 2% y se incubaron a 55 °C durante 5-10 min. A continuación, la mezcla obtenida, se pasó a una columna de sílice colocada sobre un tubo Eppendorf de 2 mL y se centrifugó a 13000 rpm durante 30 s descartando el filtrado. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 200 µL tampón de lavado (*washing buffer*, WB), y se centrifugaron ambos durante 1 min retirando el filtrado tras cada lavado. Por último, se transfirió la columna a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL, donde se añadieron 8 µL de tampón de elución (*elution buffer*, EB) dejándolo incubarse durante 1 min a temperatura ambiente para posteriormente ser centrifugado a 13000 rpm durante 1 min recogiendo el eluido.

4.2.4. Digestión y ensamblaje de plásmidos

Con el fin de construir los plásmidos que se han utilizado durante la realización de este trabajo, fue necesario manipular las secuencias de los plásmidos empleando enzimas de restricción y la unión con DNA ligasa. Para ello, se digirió el plásmido pLBLEVX-prom

con la enzima de restricción MluI en un tubo Eppendorf de 0.5 mL en los cuáles se añadió una cantidad variable del plásmido a digerir en función de su concentración, 1 μ L (10 U) de la enzima de restricción, 2 μ L de tampón de digestión (x10) y agua milli-Q hasta alcanzar un volumen de 20 μ L. Las digestiones se dejaron incubar a 37 °C durante 1 h.

Para construir el plásmido final, se utilizó el ensamblaje de Gibson. Para conseguirlo, se empleó el kit NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB). En un tubo Eppendorf de 0.2 mL se mezcló el fragmento de PCR junto con el plásmido linealizado obtenido de la digestión anteriormente comentada, con 1 volumen de *Gibson Assembly Master Mix* (2x) y, se incubó a 55 °C durante 1 h.

4.2.5. Purificación ácidos nucleicos de una solución líquida

Para purificar ácidos nucleicos de mezclas de reacción, como digestión y ensamblajes de Gibson, se siguió el kit de purificación ZYMO Research. Se traspasó la mezcla a una columna de gel de sílice colocada sobre un tubo Eppendorf de 2 mL y se añadieron 100 μ L de tampón de unión a DNA (*DNA binding buffer*, DBB). Se centrifugó a 13000 rpm durante 30 s descartando el filtrado. Tras esto, se lavó dos veces consecutivas con 200 μ L de WB centrifugando a 13000 rpm durante 30 s y descartando el filtrado después de cada lavado. Si la purificación iba a ser empleada para electroporar, se realizaba un lavado adicional con 200 μ L de etanol al 80 %, centrifugando de igual manera a 13000 rpm durante 30 s. Para finalizar, se traspasó la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y, se añadieron 8 μ L de tampón de EB. En caso de que la solución purificada fuera a ser utilizada para electroporar se añadió EB (x0.1), dejándolo incubar durante 1 min a temperatura ambiente, para posteriormente ser centrifugado a 13000 rpm durante 1 min y guardar el eluido final.

4.2.6. Electroporación de *Escherichia coli*

El plásmido generado en la reacción de ensamblaje Gibson, al que denominamos pLBLEVX-sgRNA (**Anexo I**) se transformó en células competentes de *E. coli* (DH5 α). Se mezcló el producto de la purificación junto con 40 μ L de *E. coli* competentes en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, la mezcla se traspasó a una cubeta de electroporación enfriada previamente el hielo y secada correctamente para evitar descargar durante el choque eléctrico. Se electroporaron a 1700 V durante 5 ms y, rápidamente se añadió 1 mL de medio líquido SOC (20 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 0.5 g/L de NaCl, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, glucosa 20 mM, pH 7.0) en la cubeta para recoger todas las células y devolverlas al tubo Eppendorf de 1.5 mL original. Las células fueron incubadas a 37 °C durante 1 h en agitación constante (200 rpm). Finalmente, se plaquearon 10 μ L por un lado y el resto por otro (aproximadamente 100 μ L), obtenido tras centrifugar las células a 13000 rpm durante 2 min, en dos placas Petri que contenían LB suplementado con el antibiótico necesario en función del plásmido, para poder seleccionar las colonias positivas. Se dejaron crecer las bacterias en las placas a 37 °C durante 24 h.

4.2.7. Picado de colonias y minipreparación de los plásmidos

Habiendo dejado pasar el tiempo necesario para que crecieran las bacterias en la placa, se picaron colonias aisladas de un tamaño medio con palillos estériles en un ambiente estéril por llama. Los palillos se colocaron en tubos de ensayo de 2.5 mL de medio LB junto con el antibiótico correspondiente y se llevaron a incubar a 37 °C durante 24 h en constante agitación (225 rpm).

Transcurridas las 24 h, se tomaron 2 mL del medio de cultivo donde se habían dejado creciendo las bacterias y se pasaron a un tubo Eppendorf de 2 mL para ser centrifugado a 13000 rpm durante 1 min descartando el sobrenadante. Una vez realizado esto, se purificaron los plásmidos bacterianos con el kit *Genejet Plasmid Miniprep* (Thermo Scientific). Para ello, se añadieron 250 μ L de A1 (tampón de resuspensión con RNasa) mantenido a 4 °C, resuspendiendo el sedimento obtenido anteriormente gracias a un agitador vórtex. A continuación, se añadieron 250 μ L de A2 (tampón de lisis), se mezcló por inversión 6-8 veces y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 300 μ L de A3 (tampón de neutralización) y se mezcló de nuevo 6-8 veces por inversión. La mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min y se traspasó el sobrenadante a una columna de gel de sílice donde se volvió a centrifugar a 13000 rpm esta vez durante 1 min. Posteriormente, se le añadieron 500 μ L de solución de lavado sobre la columna y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min descartando el filtrado. Por último, se le añadieron a la columna 50 μ L de tampón de elución donde se dejó incubando a temperatura ambiente durante 1 min para posteriormente ser centrifugado a 13000 rpm durante 1 min, obteniendo así el eluido, que posteriormente sería cuantificado por espectrofotometría.

4.2.8. Secuenciación de plásmidos

Con el fin de asegurarnos que las colonias picadas y eluidas mantenían el fragmento de DNA de interés, los plásmidos se secuenciaron. Para ello, se utilizaron 5 μ L de plásmido a 50 ng/ μ L junto con el cebador necesario para la secuenciación que se encontraba a 5 μ M. La secuenciación se llevó a cabo en el servicio de secuenciación del IBMCP (<https://www.csic.es/es/investigacion/catalogo-de-servicios-cientifico-tecnico/unidades-de-servicio/servicio-de-4>). Para analizar las secuencias obtenidas se emplearon las herramientas Benchling (<https://www.benchling.com>) y NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>).

4.2.9. Electroporación de *A. tumefaciens*

Una vez, se conocía que los plásmidos construidos y purificados presentaban los insertos deseados, estos se transformaron en células competentes de *A. tumefaciens* mediante electroporación. El protocolo en este caso es muy similar al comentado anteriormente para *E. coli*. En este caso, se emplearon 0.5 μ L de plásmido con 40 μ L de células de *A. tumefaciens* competentes. Se electroporaron siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 4.2.6, en este caso las células se incubaron a 28 °C durante 2 h en agitación constante (200 rpm). Una vez transcurrido ese tiempo, se plaquearon 10 μ L y el resto, en placas de Petri distintas, que contenían medio LB suplementado con los antibióticos kanamicina y rifampidicina (ambos a 50 μ g/mL), donde se dejaron creciendo las bacterias a 28 °C durante 2 días.

4.2.10. Agroinfiltración de plantas

Habiendo dejado pasar 2 días, se picaron colonias aisladas de un tamaño intermedio y se llevaron a un tubo de ensayo con 10 mL de medio LB suplementado con kanamicina (50 μ g/mL) y se dejaron crecer a 28 °C en agitación constante (200 rpm) hasta mostrar una turbidez (aproximadamente 1 día). A continuación, se midió la densidad óptica (DO) de los cultivos gracias a un espectrofotómetro y se seleccionaron aquellos cultivos que presentaban una DO a 600 nm de entre 0.5 y 1.5. Una vez habían sido medidas las DO y se habían seleccionado que cultivos se iban a emplear en la agroinfiltración, se calculó el volumen necesario para llevar el cultivo a una OD de 0.5 en un volumen final de 1.8 mL de medio de agroinfiltración (MES-NaOH 10 mM a pH 5.6, de MgCl₂ 10 mM). A continuación, la mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 3 min descartando el

sobrenadante y, se resuspendió en 1.8 mL de medio de agroinfiltración con la ayuda de un agitador vortex. A cada una de las preparaciones, se le adicionaron 2.7 μL de acetosiringona (150 μM) y, se incubaron a 28 °C durante 2 h.

Transcurrido ese tiempo, se procedió a infiltrar los cultivos de *A. tumefaciens* en las plantas. Para ello, se apoyó una jeringa, a la que se le había retirado la aguja previamente, en el envés de la hoja aplicando una ligera presión con el dedo en el haz de la misma y, comprobando que la hoja cambiara de color por la entrada del cultivo en el apoplasto. Se inocularon plantas de *Nicotinana benthamiana*, y plantas de lechuga de la variedad Reina Mayo y la variedad Romana Mantecosa. En los tres casos, se dejó una maceta sin inocular como control. Las plantas se llevaron al fitotrón donde se dejaron crecer en condiciones controladas (16 h luz, 25 °C) a la espera de tomar muestras a los 5-10 días postinoculación (dpi).

4.2.11. Extracción de RNA de plantas infectadas

Con la ayuda de unas pinzas, se recogieron aproximadamente 0.1 g de tejido infectado de las plantas y se introdujeron en tubos Eppendorf de 2 mL en los que en su interior había una bolita de acero (4 mm) y, se congelaron en N_2 líquido. A continuación, a los tubos se le añadió 1 mL de tampón de extracción (tiocianato de guanidinio 4M, Acetato sodio 0.1 M a pH 5.5, EDTA 10 mM, 2-mercaptoetanol 0.1 M) y, se llevó a moler (Star-Beater, VWR) a 30 s^{-1} durante 1 min. Tras ello, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min y se recogieron 600 μL del sobrenadante que se pasaron a un tubo Eppendorf de 1.5 mL al que se adicionaron 390 μL de etanol al 96% y se mezcló por agitación con la ayuda de un vórtex para ser centrifugado a 13000 rpm durante 1 min. Posteriormente, se transfirieron 700 μL del sobrenadante a una columna de gel de sílice que se encontraba posicionada sobre un tubo Eppendorf de 2 mL, se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min descartando el filtrado. A continuación, se realizaron dos lavados consecutivos con 500 μL de tampón de lavado (etanol al 70%, acetato sódico 10 mM a pH 5.5) Ambos se centrifugaron a 13000 rpm, el primero de ellos durante 30 s y, el segundo durante 1 min. Tras ambos lavados se descartó el filtrado. Por último, se añadieron 10 μL de tampón de elución (Tris-HCl 20 mM a pH 8.5) en la columna y se dejó incubar durante 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 13000 rpm durante 2 min. El RNA eluido se congeló rápidamente en el caso de que no fuera usado inmediatamente o se mantuvo en hielo si iba a ser utilizado en el momento.

4.2.12. Retrotranscripción (RT) de RNA y amplificación de cDNA mediante PCR

Se realizó la transcripción inversa del RNA a cDNA. En tubos Eppendorf de 0.2 mL se añadió una mezcla de 1 μL de cebador (5 μM), 1 μL de RNA purificado y 4.5 μL de agua Milli-Q. Las preparaciones se incubaron en un termociclador a 90 °C durante 90 s, cuando la temperatura del termociclador bajó hasta los 42 °C, se pausó el programa y a cada preparación se le añadieron: 1 μL de dNTPs (10 mM), 2 μL de tampón RT (x5) (Tris-HCl 250 mM, KCl 250 mM, MgCl_2 20 mM, DTT 50 mM), 0.25 μL de inhibidor de RNasas (40 U/ μL) y 0.25 μL de retrotranscriptasa M-MuLV-RT (200 U/ μL). Seguidamente, se reanudó el programa y se incubaron las reacciones a 42 °C durante 45 min, a 50 °C durante 10 min, a 60 °C durante 5 min y para finalizar a 70 °C durante 15 min para inactivar la enzima RNasa y obtener así el cDNA.

Una vez obtenido el cDNA, se realizó una amplificación de este por PCR empleando la polimerasa *Phusion*. Para cada reacción, se emplearon las mismas cantidades que se han comentado en el apartado 3.1. A continuación, se introdujeron las preparaciones en el termociclador siguiendo el programa que se describe en la Tabla 2.

4.2.13. Cultivo de las plantas en el invernadero

Las plantas que se emplearon durante este trabajo se cultivaron en el invernadero del IBMCP en condiciones controladas de temperatura (25 °C) y fotoperiodo (16 h día / 8 h noche). Las plantas se sembraron en semilleros donde se dejaron crecer hasta tener un tamaño adecuado para ser trasplantadas a macetas grandes. Cuando tuvieron el tamaño óptimo se inocularon por agroinfiltración. Tras ello, se llevaron las plantas al fitotrón, con las mismas condiciones comentadas anteriormente, para que siguieran su desarrollo.

5. Resultados y discusión

5.1. Transformación genética de lechugas

El primer objetivo de este trabajo fue transformar genéticamente plantas de lechuga para expresar de manera constitutiva SpCas9 en dos variedades comerciales de lechuga, Romana Reina Mayo y Trocadero Mantecosa.

Para conseguir este objetivo, se emplearon explantes de cotiledón y de hoja de plántulas de 11 días de edad. Se observó que la variedad Romana Reina Mayo era aquella que presentaba tasas de germinación mayores que Trocadero Mantecosa como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Tasa de germinación de semillas de las variedades Romana Reina Mayo y Trocadero Mantecosa.

Variedad	Nº semillas inicial	Nº semillas germinadas	Tasa de germinación
Romana Reina Mayo	168	124	73,81%
Trocadero Mantecosa	168	19	11,31%

Con el fin de favorecer el crecimiento rápido y la supervivencia de los explantes durante el experimento se realizó una etapa de precultivo de los explantes de hoja y cotiledón de ambas variedades. Los explantes de cotiledón pertenecían principalmente a la variedad Romana Reina Mayo, mientras que los de hoja pertenecían a la variedad Trocadero Mantecosa, ya que los cotiledones de esta segunda variedad tenían un tamaño muy pequeño para ser manipulados. Tras la etapa de precultivo, se pudo observar que los explantes eran más firmes y fáciles de manejar, por lo que se procedió al cocultivo de los explantes junto con la cepa de *A. tumefaciens* que portaba el plásmido pLBHigCas9 y posteriormente, el lavado de estos.

A continuación, se transfirieron los explantes al medio de organogénesis para favorecer la formación de callos. Este medio se encontraba suplementado con higromicina como medio de selección de plantas transgénicas. Tras 26 días en el medio de organogénesis, se observó la aparición de callos organogénicos en los explantes (**Figura 6**). Cabe destacar que los explantes de cotiledón presentaban mayor formación de callo frente a los explantes de hoja.

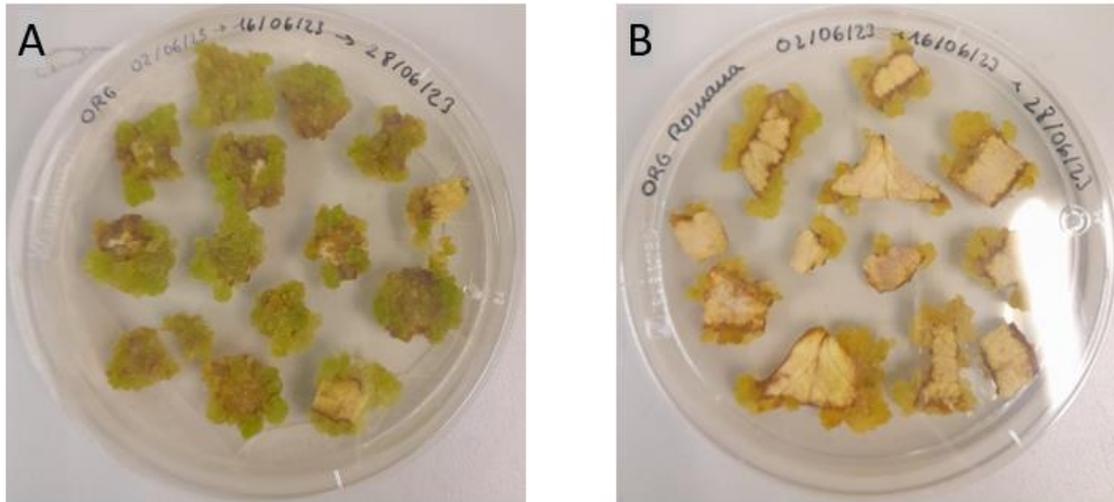


Figura 6. Formación de callos organogénicos en explantes de cotiledón y hoja en las variedades (A) Romana Reina Mayo y (B) Trocadero Mantecosa.

A lo largo del ensayo, se observó que pese a la adición de PVP al medio algunos de los explantes, principalmente los de hoja, se iban oxidando por las zonas de corte, lo que a su vez provocaba la oxidación del medio, dando como resultado la muerte de los explantes (**Figura 7**). Por ello, se fueron eliminando los explantes más dañados de cada placa para favorecer la supervivencia del resto.



Figura 7. Oxidación del medio de organogénesis y muerte de los explantes de hoja y cotiledón.

Se observó que los explantes de la variedad Trocadero Mantecosa eran más susceptibles a la oxidación que los de la variedad Romana Reina Mayo. Finalmente, debido a las oxidaciones, no se consiguieron regenerar brotes a partir de los explantes ya que estos no sobrevivieron al ensayo en ninguna de las dos variedades, por lo que no se pudo transformar la lechuga de manera efectiva para la expresión de SpCas9.

Uno de los factores limitantes en la transformación genética de la lechuga mediada por *A. tumefaciens* es la falta de un protocolo eficiente de regeneración. Observando los resultados experimentales de este trabajo podemos indicar que el protocolo de regeneración utilizado no es el adecuado para la transformación genética de las variedades de lechuga empleadas. Pese a que la lechuga es una especie de alto interés

agronómico, el estudio de su regeneración mediante cultivo *in vitro* no está tan avanzado, ni existe tanta bibliografía referente a este tema como en otras especies de interés como son el tomate, el maíz o el trigo. Por ello, para la realización de este trabajo se emplearon como referencia los protocolos empleados en el trabajo de Lupan et al. (2010) y en el trabajo de Mohebondini et al. (2014) en los que se consiguieron transformar plantas de lechuga para que expresasen los genes de interés.

El oscurecimiento letal de los explantes y el medio de cultivo, es un problema común durante el establecimiento *in vitro* de los tejidos vegetales (Azofeifa, 2008). En nuestro trabajo, el principal inconveniente al que nos enfrentamos durante la transformación genética fue esta oxidación, por ello, como medida de prevención se adicionó al medio PVP como en el trabajo de Kanamoto et al. (2016), en el cual se observaba la misma problemática. Los resultados han indicado que la concentración de PVP adicionada al medio (500 mg/L), no ha sido suficiente para evitar el oscurecimiento del medio de cultivo y de los explantes. Podría ser interesante emplear otros métodos para evitar la oxidación como, aumentar las concentraciones de PVP en el medio y ver como dichas concentraciones afectan a los explantes. En otros estudios con otras especies que también presentan dicho problema se han empleado diversas sustancias con el fin de evitar la oxidación como son el carbón activo en el caso del trabajo del Aliyu & Mashood (2005), que lo empleo en *Anacardium occidentale* (anacardo) o en el caso del trabajo de Joy et al. (1988) en el que empleó ácido ascórbico y ácido cítrico que disminuyeron considerablemente la oxidación de los explantes en *Nicotiana tabacum*.

Sería interesante en un futuro modificar las condiciones de los medios de cultivo para obtener un buen protocolo de regeneración para las variedades comerciales de lechuga empleadas en este trabajo.

5.2. Construcción del vector viral

El segundo objetivo de este proyecto fue la construcción de un vector viral derivado del LeVX que expresara sgRNAs para edición genética de CRISPR/Cas en lechuga. Se decidió expresar un sgRNA de Cas9 contra la magnesio quelatasa (CHLI) de lechuga, ya que la falta de funcionalidad de esta proteína (provocada por una mutación puntual, por ejemplo), da lugar a un fenotipo blanquecino identificable a simple vista.

Para ello, se emplearon dos plásmidos. Por un lado, el plásmido base pLBLeVX-prom obtenido anteriormente en el laboratorio capaz de replicarse tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*, que presenta el sitio MluI de clonación, de manera que permite que se introduzca DNA de interés. Por otro lado, el plásmido pPVX:sgxT2B. De esta manera, la secuencia del sgRNA fue obtenida mediante PCR (**Figura 8**), empleando los cebadores D5457 y D5458, presentando el primero de ellos el crRNA mientras que el molde de la PCR (el plásmido pPVX:sgxT2B) presentaba el tracrRNA.

A continuación, se utilizó el método de ensamblaje de Gibson en el que se fusionó la secuencia de interés junto con el vector pLBLeVX-prom digerido con la enzima MluI (**Figura 9**).

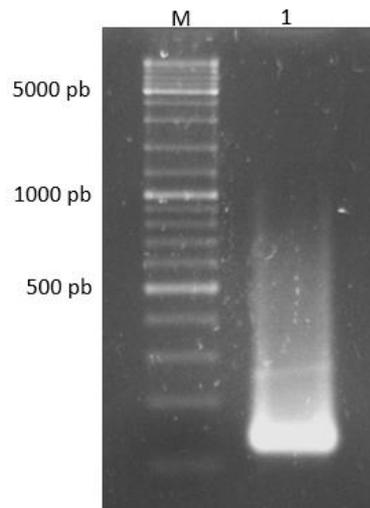


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR con el fragmento de sgRNA amplificado (136 pb). Carril M, marcador de tamaño.

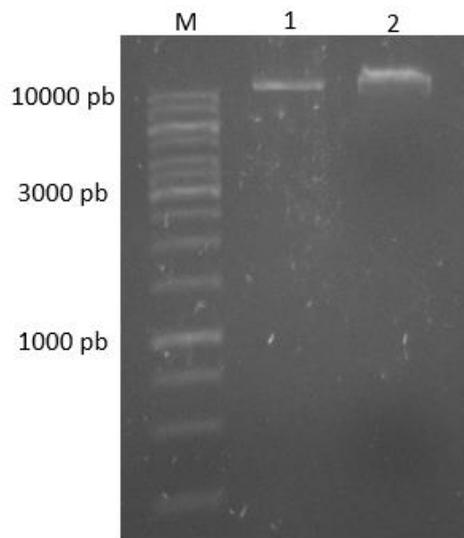


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa del vector digerido con la enzima MluI. Carril M, marcador de tamaño; carril 1, control negativo de la digestión; carril 2, plásmido pLBLeVX-prom digerido con MluI.

Una vez construido el plásmido final (pLBLeVX-sgRNA), se purificó el DNA plasmídico para confirmar en un gel de agarosa si presentaba el tamaño adecuado de la construcción (**Figura 10**). Dado que la secuencia introducida presentaba un tamaño muy pequeño respecto al plásmido control (136 pb), la construcción final se secuenció para asegurarnos de que se mantenía la secuencia y no se habían producido mutaciones (**Figura 11**).

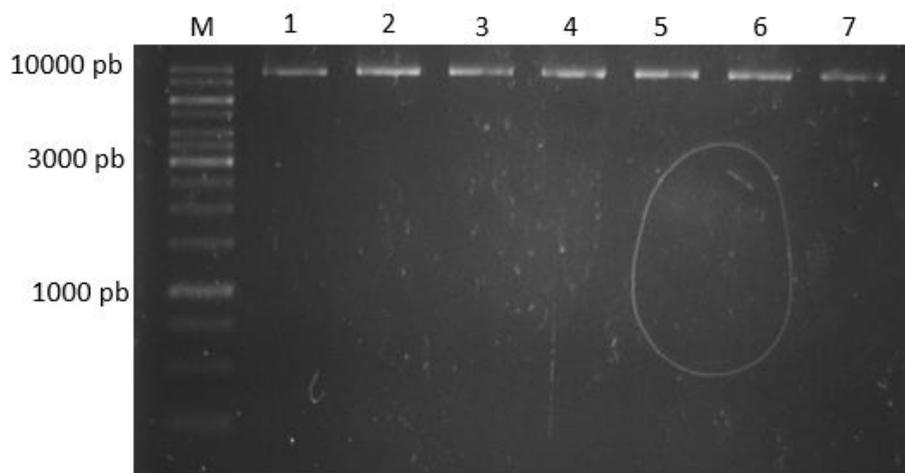


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmídico purificado de la construcción final. Carril M, marcador de tamaño; carril 1, control pLBLEVX, carriles 2 a 7, plásmidos con la inserción del sgRNA.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
704 bits(381)	0.0	389/392(99%)	3/392(0%)	Plus/Plus
Query 40	CTCAATTGTGAAACTTTGAGAAC	TTCCCTTTCAACATACCAGGGGAACCC	CACAAGCTG	99
Sbjct 9	CTC-ATTGTG-AACTTTGAG-AC	TTCCCTTTCAACATACCAGGGGAACCC	CACAAGCTG	65
Query 100	ACATCGACGTATAAAATCCCGG	TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA	AAATAAGGCTAGT	159
Sbjct 66	ACATCGACGTATAAAATCCCGG	TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA	AAATAAGGCTAGT	125
Query 160	CCGTTATCAACTTGAAAAAGTGG	CACCGAGTCGGTGCTAGGGTTTGT	TAAAGTTCCCTTT	219
Sbjct 126	CCGTTATCAACTTGAAAAAGTGG	CACCGAGTCGGTGCTAGGGTTTGT	TAAAGTTCCCTTT	185
Query 220	TTACTCGAAAGATGGGTACCCCT	CAAGCAGTCAACACCCCGGTCAACA	ACCCGCCAGGC	279
Sbjct 186	TTACTCGAAAGATGGGTACCCCT	CAAGCAGTCAACACCCCGGTCAACA	ACCCGCCAGGC	245
Query 280	CGACCCAGTTCTCCAGCGTCTCC	AGCTAACTTCCGGTCCCAACCTCG	CCGACCCAA	339
Sbjct 246	CGACCCAGTTCTCCAGCGTCTCC	AGCTAACTTCCGGTCCCAACCTCG	CCGACCCAA	305
Query 340	ACCGCGCACCTTCCATGGAAGAC	CTCGCCAGGTCAAATATGTGTCTT	CCTCCTCGCGC	399
Sbjct 306	ACCGCGCACCTTCCATGGAAGAC	CTCGCCAGGTCAAATATGTGTCTT	CCTCCTCGCGC	365
Query 400	TCGCCACCCCGGCCAAATCACCA	AACTCGGC	431	
Sbjct 366	TCGCCACCCCGGCCAAATCACCA	AACTCGGC	397	

Figura 11. Alineamiento de un fragmento de la secuencia del plásmido pLBLEVX con el inserto de sgRNA.

Habiendo confirmado que pLBLEVX-sgRNA estaba correctamente construido, este plásmido se utilizó para transformar *A. tumefaciens*. El clon resultante se utilizó para agroinfiltrar plantas de *N. benthamiana* y posteriormente plantas de variedades comerciales de lechuga, y así comprobar la expresión del sgRNA en ellas. Para comprobar que los cultivos de las colonias seleccionadas con los que íbamos a agroinfiltrar las plantas presentaban el inserto deseado de sgRNA, se llevó a cabo una minipreparación de estos, y posteriormente se realizó una PCR empleando los cebadores D5347 y D5348 la secuencia de interés y se realizó una comparación por electroforesis junto con el producto del plásmido pLBLEVX-prom como control. El resultado mostró que el producto de PCR del control presentaba un tamaño menor, que se observa por la mayor movilidad electroforética en el gel de agarosa (**Figura 12**).

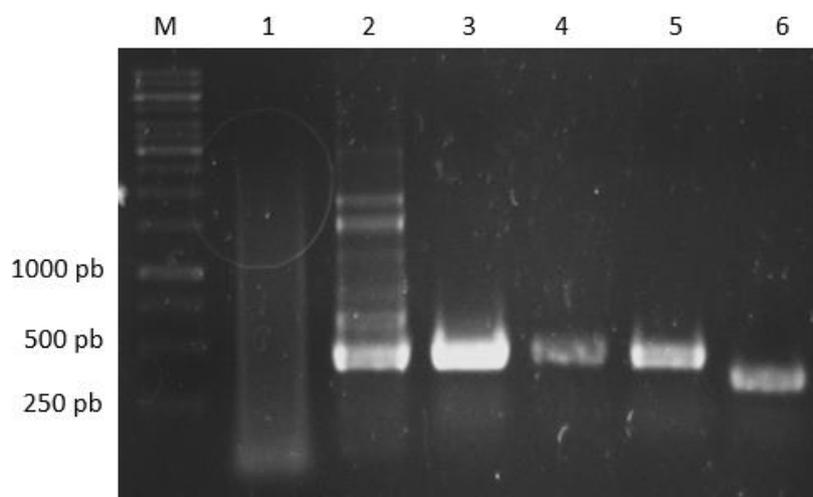


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR del fragmento de sgRNA de interés. Carril M, marcador de tamaño; carril 1, control negativo de PCR; carriles 2 a 4, producto de PCR del fragmento sgRNA proveniente de la minipreparación de los cultivos de *A. tumefaciens*; carril 5, control positivo del fragmento de interés (plásmido original transformado); carril 6, control de pLBLeVX-prom sin el fragmento de interés.

El último objetivo de esta parte del trabajo era confirmar si el vector viral construido permitía expresar el sgRNA en las lechugas. Para ello, primero decidimos comprobar la capacidad infectiva de la construcción en plantas de *N. benthamiana*. Se agroinfiltraron un total de 12 plantas de entre 3 y 4 semanas de edad, manteniendo además una maceta con tres plantas controles sin inocular. A partir de los 5 dpi, se observaron síntomas de infección viral en el tejido sistémico de las plantas inoculadas, como es el enrollamiento hacia abajo de las hojas. A partir de los 7 dpi, se pudo apreciar la aparición de moteados en las mismas, mientras que los controles negativos no mostraban ningún síntoma (**Figura 13**). Dichos resultados eran comparables con los obtenidos por Dizadji et al. (2008b), los cuales tras inocular planta de *N. benthamiana* con este mismo virus, observaron que las hojas inoculadas se mantenían asintomáticas, mientras que en el tejido sistémico se apreciaba el enrollamiento hacia abajo y el moteado.



Figura 13. Plantas de *N. benthamiana* a distintos tiempos tras ser inoculadas con el vector pLBLeVX que expresa el sgRNA. (A) Plantas control sin inocular. (B, C y D) Plantas inoculadas a los 5, 7 y 14 dpi respectivamente.

Posteriormente, se realizó un diagnóstico molecular para confirmar la presencia de sgRNA en las plantas. Para ello, se tomaron muestras de tejido de hojas apicales de las plantas inoculadas. Se purificó el RNA y empleando el cebador D5107 se realizó una retrotranscripción. El cDNA se amplificó por PCR empleando los cebadores D5347 y D5348. Se tomaron muestras a 5, 7 y 14 dpi para poder analizar así la evolución del

virus con el tiempo en las plantas. El diagnóstico molecular, confirmó la presencia de la secuencia correspondiente al sgRNA en las plantas inoculadas a los 5 y 7 dpi, ya que podía observarse bandas a una altura de 431 pb en comparación con las bandas a la altura 339 pb que correspondían al tamaño del fragmento control que no presentaba la secuencia de interés (**Figura 14**).

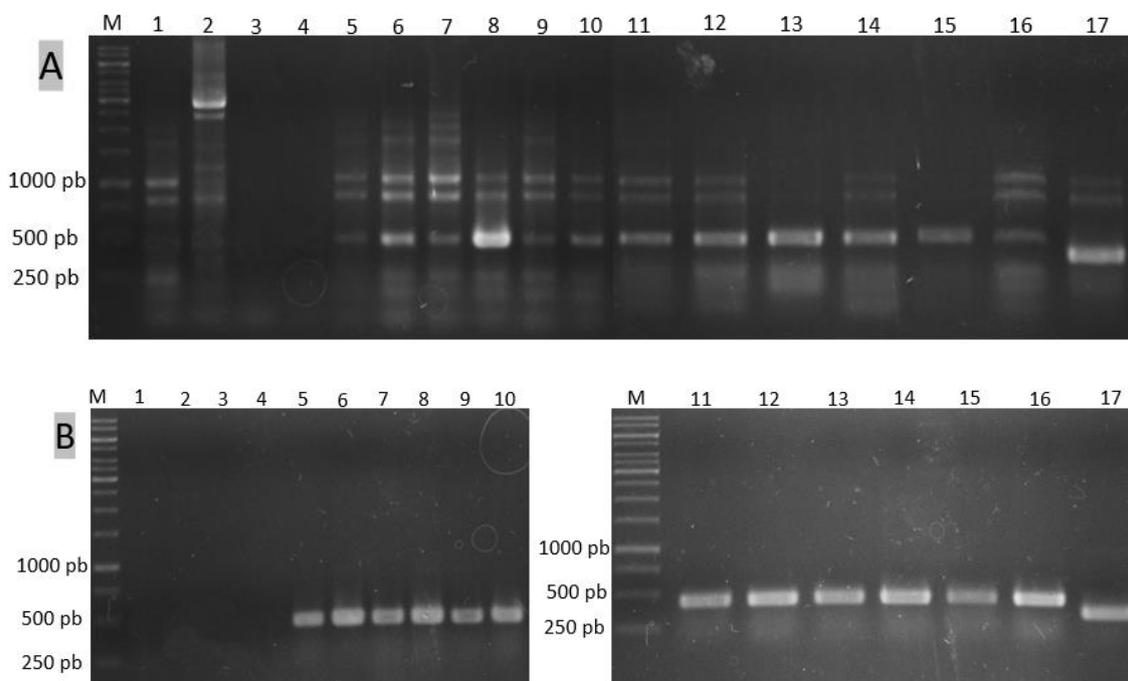


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación RT-PCR en plantas de *N. benthamiana* (**A y B**) a los 5 y 7 dpi respectivamente. Carril M, marcador de tamaño de DNA; carriles 1 y 2, controles negativos de plantas sin inocular; carriles 3 y 4, controles negativos de RT-PCR y PCR; carriles 5 a 16 muestras de hoja de plantas inoculadas; carril 17, control de una planta inoculada con pLBLEVX-prom sin el fragmento de interés.

En cuanto a los resultados obtenidos a los 14 dpi. Se tomaron muestras de 6 de las plantas inoculadas, en las que el diagnóstico molecular reveló que en solo una de ellas se observaba una banda del tamaño esperado (431 pb) (**Figura 15**). La amplificación de la banda al tamaño correspondiente y no de un tamaño menor, nos indica que a los 14 dpi todavía se mantiene el inserto. En cuanto al resto de muestras, dado que el tejido se tomó de hojas que presentaban síntomas cabría esperar que se observaran bandas a la altura correspondiente, por lo que ausencia de estas puede deberse a una baja eficiencia durante el proceso de extracción de RNA y/o RT-PCR, y no es posible sacar conclusiones acerca de estas.

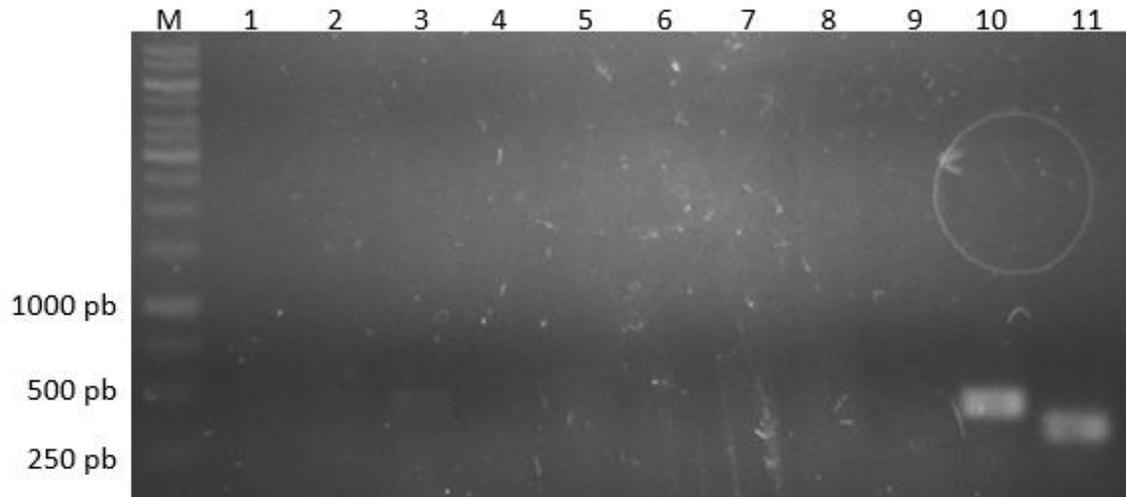


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación RT-PCR a los 14 dpi en plantas de *N. benthamiana*. Carril M, marcador de tamaño de DNA; carriles 1 y 2, controles negativos de plantas sin inocular; carril 3 y 4, controles negativos de RT-PCR y PCR; carriles 5 a 10, muestras de hoja de plantas inoculadas; carril 11, control de planta inoculada con pLBLeVX-prom sin el fragmento de interés.

A continuación, se realizó el mismo ensayo esta vez en plantas de lechuga de las variedades comerciales. En este caso, se agroinfiltraron un total de 6 plantas de la variedad Romana Reina Mayo y 4 plantas de la variedad Trocadero Mantecosa de 11 días de edad, manteniendo una planta como control negativo sin inocular. En las plantas inoculadas tras los 14 dpi, se pudo observar un arrugamiento de la hoja, pero no curvatura hacia debajo de la hoja (**Figura 16**). Dado que este síntoma también se podía apreciar en la planta control, que se encontraba separada del resto de plantas inoculadas, existe la posibilidad de que sea causado por que las condiciones dentro del fitotrón no sean del todo las adecuadas para el desarrollo de las plantas de lechuga. Por lo que, al igual que en los resultados obtenidos por Dizadji et al. (2008b), las plantas de lechuga infectadas parecen mantenerse asintomáticas y debe ser necesario realizar un diagnóstico molecular para conocer si son susceptibles al LeVX. Cabe destacar que no se mostraban diferencias visuales en los síntomas entre las variedades empleadas en la inoculación.

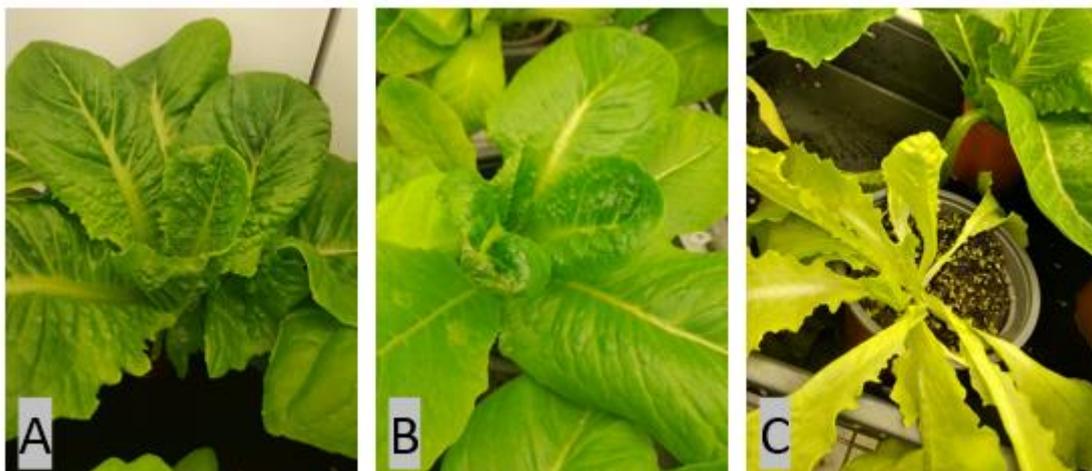


Figura 16. Plantas de lechuga a 14 dpi. (A) Plantas control sin inocular, (B) plantas de la variedad Romana Reina Mayo y (C) plantas de la variedad Trocadero Mantecosa.

Finalmente, se analizó la expresión viral por RT-PCR repitiendo el mismo procedimiento empleado en las plantas de *N. benthamiana*. En el diagnóstico molecular se observó que, a los 5 dpi, 3 de las 10 plantas analizadas mostraban la presencia de RNA viral, en las cuáles además se amplificó el inserto del sgRNA, ya que en la electroforesis de gel de agarosa se podía observar una banda a la altura correspondiente (431 pb) (**Figura 17**). Analizando los resultados obtenidos, se puede observar que en plantas de lechuga el vector viral derivado del LeVX es menos infectivo que en las plantas de *N. benthamiana*.

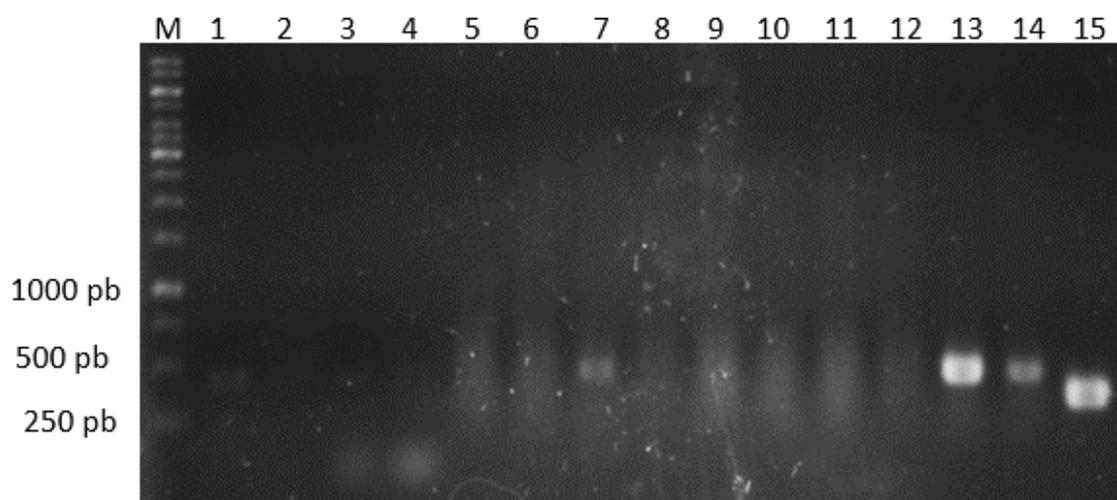


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación RT-PCR a los 5 dpi en plantas de lechuga comercial. Carril M, marcador de tamaño de DNA; carriles 1 y 2, controles negativos de plantas sin infectar; carril 3, control negativo de RT-PCR; carril 4, control negativo de PCR; carriles 5 a 7 y 10 a 12, muestras de hoja de lechugas Romana Reina Mayo inoculadas; carriles 8, 9, 13 y 14, muestras de hoja de lechugas Trocadero Mantecosa inoculadas (muestras positivas carriles 7, 13 y 14); carril 15, control de planta inoculada con pLBLeVX-prom sin el fragmento de interés.

En este trabajo se han llevado a cabo experimentos que nos permitirán avanzar en el campo de la mejor genética de la lechuga. España fue en 2021 el quinto productor mundial y el primero europeo de dicho cultivo (FAOSTAT). Pese a ello, esta especie se enfrenta a numerosas plagas y enfermedades, que pueden dar lugar a pérdidas catastróficas, como es el caso del mildiu (Rodríguez-Porto, et al., 2021). Sin duda, el sistema de edición genética CRISPR/Cas es una vía idónea que nos permite hacer frente a estos problemas de manera relativamente rápida. En este trabajo final de máster, se han intentado transformar dos variedades comerciales de lechuga que expresasen la nucleasa SpCas9. No obstante, no se han podido regenerar líneas transformadas debido a la falta de un protocolo contrastado. Por lo tanto, se ha llevado a cabo un experimento alternativo pero complementario, para evaluar la capacidad de un vector viral, derivado del LeVX, de expresar el otro componente necesario para la edición CRISPR/Cas9: el sgRNA. Tras desarrollar un vector para expresar el sgRNA, este ha sido utilizado para inocular plantas de la especie modelo *N. benthamiana*, así

como dos variedades distintas de lechuga. Nuestros resultados concluyen que dicho vector es infectivo en ambas especies, y que además puede expresar el inserto con el sgRNA, como mínimo, hasta los 14 dpi (al menos en *N. benthamiana*). Según experimentos previos hechos en nuestro laboratorio, estos 14 días son suficientes para detectar edición si consiguiéramos expresar simultáneamente la nucleasa SpCas9, por lo que podemos concluir que el vector desarrollado tiene una alta probabilidad de ser funcional.

6. Conclusiones

1. No se ha conseguido transformar genéticamente plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) para que expresen constitutivamente SpCas9 debido a la oxidación de los explantes durante el proceso de regeneración.
2. Se ha construido con éxito un vector viral derivado de un aislado de LeVX que lleva insertado una secuencia de sgRNA.
3. El vector viral construido es capaz de infectar plantas de *Nicotiana benthamiana* produciendo síntomas visibles desde los 5 dpi, manteniéndose el sgRNA insertado, como mínimo, hasta los 14 dpi.
4. La detección visual de nuestro vector derivado del LeVX en variedades comerciales de lechuga es muy complicada debido a que estas permanecen asintomáticas. Por lo tanto, es necesario emplear técnicas de detección molecular para detectar la presencia de dicho virus. Además, la infectividad de este vector en lechugas es menor que en *N. benthamiana*.

7. Bibliografía

- Aliyu, O. M., & Mashood. (2006). Application of tissue culture to Cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: an appraisal. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/228512519_Application_of_tissue_culture_to_cashew_Anacardium_occidentale_L_breeding_An_appraisal
- Atiq, G. (2019). Plant transformation in biotechnology. https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3446375
- Azofeifa, Á. (2008). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153. <https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
- Bhatia, S., Pooja, N., & Yadav, S. K. (2023). CRISPR-Cas for genome editing: Classification, mechanism, designing and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 238, 124054. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124054>
- Cao, Y., Zhou, H., Zhou, X., & Li, F. (2020). Control of plant viruses by CRISPR/CAS System-Mediated Adaptive Immunity. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.593700>
- Dizadji, A., Koochi-Habibi, M., Izadpanah, K., Dietrich, C. P., Mossahebi, G. H., & Winter, S. (2008b). Characterisation of lettuce virus X, a new potexvirus infecting lettuce in Iran. *Archives of Virology*, 153(10), 1867-1875. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0191-x>
- FAOSTAT. (s. f.). <https://www.fao.org/faostat/es/#home>
- Genus: *Potexvirus* | ICTV. (s. f.). <https://ictv.global/report/chapter/alphaflexiviridae/alphaflexiviridae/potexvirus>
- Gleba, Y., Klimyuk, V., & Marillonnet, S. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 134-141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.002>
- Gupta, R., & Musunuru, K. (2014). Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *Journal of Clinical Investigation*, 124(10), 4154-4161. <https://doi.org/10.1172/jci72992>
- Hartung, F., & Schiemann, J. (2014). Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *The plant journal*, 78(5), 742-752. <https://doi.org/10.1111/tpj.12413>
- Huang, Y., Shang, M., Liu, T., & Wang, K. (2022). High-throughput methods for genome editing: the more the better. *Plant Physiology*, 188(4), 1731-1745. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac017>
- Joung, J. K., & Sander, J. D. (2012). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(1), 49-55. <https://doi.org/10.1038/nrm3486>
- Joy, R. W., Patel, K., & Thorpe, T. A. (1988). Ascorbic acid enhancement of organogenesis in tobacco callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 13(3), 219-228. <https://doi.org/10.1007/bf00043670>

- Kaur, N., Sharma, S., Hasanuzzaman, M., & Pati, P. K. (2022). Genome Editing: A Promising Approach for Achieving Abiotic Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Genomics*, 2022, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2022/5547231>
- Koonin, E. V., & Makarova, K. S. (2019). Origins and evolution of CRISPR-CAS Systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1772), 20180087. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0087>
- Kujur, S., Senthil-Kumar, M., & Kumar, R. (2021). Plant Viral Vectors: Expanding the possibilities of precise gene editing in plant genomes. *Plant Cell Reports*, 40(6), 931-934. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02697-2>
- Lacroix, B., & Citovsky, V. (2020). Biolistic approach for transient gene expression studies in plants. *Methods in molecular biology* (pp. 125-139). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7_6
- Li, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C., & Wei, J. (2017). Application of CRISPR/CAS9 in plant biology. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(3), 292-302. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.01.002>
- Liu, Z., Dong, H., Cui, Y., Liu, C., & Zhang, D. (2020b). Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microbial Cell Factories*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01431-z>
- Lough, T. J., Netzler, N. E., Emerson, S., Sutherland, P., Carr, F., Beck, D. L., Lucas, W. J., & Forster, R. L. S. (2000). Cell-to-Cell movement of potexviruses: evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 13(9), 962-974. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2000.13.9.962>
- Lupan, I., Valimareanu, S., Coste, A., & Popescu, O. (2010). Molecular cloning of agglutinin gene from *Galanthus nivalis* for lettuce transformation. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/228772002_Molecular_cloning_of_agglutinin_gene_from_Galanthus_nivalis_for_Lettuce_transformation
- Mohanta, T. K., Bashir, T., & Kumar, A. (2017). Systems biology approach in plant abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 121, 58-73. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.10.019>
- Mohanta, T. K., Bashir, T., Kumar, A., & Bae, H. (2017). Genome Editing Tools in Plants. *Genes*, 8(12), 399. <https://doi.org/10.3390/genes8120399>
- Mohebodini, M., Jalali-Javaran, M., Alizadeh, H., Mahboudi, F., & Yarbakht, M. (2014). Agrobacterium-Mediated transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to express IGG-binding protein A and human pro-insulin as a fusion protein. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 89(6), 719-725. <https://doi.org/10.1080/14620316.2014.11513143>
- Nidhi, S., Anand, U., Oleksak, P., Tripathi, P., Lal, J. A., Thomas, G., Kuca, K., & Tripathi, V. (2021). Novel CRISPR–CAS Systems: An updated review of the current achievements, applications, and future research perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3327. <https://doi.org/10.3390/ijms22073327>

- Oh, Y., Kim, H., & Kim, S. (2021b). Virus-induced plant genome editing. *Current Opinion in Plant Biology*, 60, 101992. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.101992>
- Priyadarshan, P. M. (2019). PLANT BREEDING: Classical to Modern. *Springer eBooks*. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-7095-3>
- Puchta, H., & Fauser, F. (2013). Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *Plant Journal*, 78(5), 727-741. <https://doi.org/10.1111/tpj.12338>
- Ramkumar, T. R., Lenka, S. K., Arya, S. S., & Bansal, K. C. (2020). A short History and perspectives on plant genetic transformation. *Methods in molecular biology* (pp. 39-68). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7_3
- Rodrigues-Porto, L., N. Raid, R., V. Sandoya, G. (2021) Downy Mildew of Lettuce in Florida. IFAS extension University of Florida, HS1403. <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/HS1403>
- Semenova, E., & Severinov, K. (2017). Interdependencies Between the Adaptation and Interference Modules Guide Efficient CRISPR-Cas Immunity. *Evolutionary Biology: Self/Nonself Evolution, Species and Complex Traits Evolution, Methods and Concepts* (pp. 51–62). https://doi.org/10.1007/978-3-319-61569-1_3
- Uranga, M., & Daròs, J. (2022). Tools and Targets: The dual role of plant viruses in CRISPR–CAS genome editing. *The Plant Genome*, 16(2). <https://doi.org/10.1002/tpg2.20220>
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. V., Zhang, H. Y., & Gregory, P. D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), 636-646. <https://doi.org/10.1038/nrg2848>
- Van Beljouw, S. P. B., Sanders, J., Rodríguez-Molina, A., & Brouns, S. J. J. (2022). RNA-targeting CRISPR–CAS systems. *Nature Reviews Microbiology*, 21(1), 21-34. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00793-y>
- Van Der Vlugt, R., & Berendsen, M. (2002). Development of a general potyvirus detection method. *European Journal of Plant Pathology*, 108(4), 367-371. <https://doi.org/10.1023/a:1015644409484>
- Van Vu, T., Das, S., Hensel, G., & Kim, J. (2022). Genome editing and beyond: what does it mean for the future of plant breeding? *Planta*, 255(6). <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03906-2>
- Yin, K., Han, T., Guang, L., Chen, T., Wang, Y., Yu, A. Y. L., & Liu, Y. (2015). A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/CAS9 mediated plant genome editing. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep14926>
- Zhu, H., Li, C., & Gao, C. (2020). Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(11), 661–677. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00288-9>

Anexo I

>pLBLEVX-sgRNA (10 874 pb)

GATTCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATG
CCATCATTTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCCTGCGGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCC
CCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTG
ATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTCCTCTATATAAGG
AAGTTCATTTCAATTTGGAGAGCGAAAACTAAACAAAACAAAACGAAAACAAACTTAAACCTCTCCACACAT
AACCACAGGCCAAAAACCGGAAAAACCCCTCCACTTTTCGCTATTATGTGCGAGAATTCGTAACGTTTTGGAT
AGGATCAGAGACCCCTCCGTACAACTGCTATTTGCGAATCCGCTTATACACAAATACGGCCAGTCCCTGA
AAGAAGCCCTAATTAACCTGCCCTTACGCTCTGAACGACAATGAGGCTGACGCACCTAGAGAATTTAGGCAT
CTCTGTCAACCCCTACCCTGTTCAAACCCACACCCACGCTGCGGCTAAAGCCATCGAGAATCAAATGCCA
CAGATTGTGGGCCACCCCTACCCAAAGTCCAAAGTCACTTCCCTCTTTCTCAAGAGAAGCAAGCTACGCT
ACCTTAGAAGAGCGGCCGCACTGAAAGACACATTCATGAACAAAGAAGTGGAGCCCAAAGACTTCTTTTCG
CTACGACTCCGACACCATCCACTCCCGCATACAAGAAGTCAGCACCAGCGTGGCGTACATGTCCGACACC
TTACACTTTATGACTCTTGAAGAGCTCGCACACCTCTTTGAGTCATCGCCCCGACTGGACACCCCTCCTGG
CCACCGTAGTGCTTCCCGTGGAGGCCCTTGCATCGCAAAACCTCACTACACCCGGCCGTGTACTCCATAAA
CTACAATAAAGACGGCTTTGAGTACATCCCTGGCAACCATGGCGGCGGAGCTTACTTCCACCCGTACAAC
ACACTGGAATGGCTCAAAGTCCGGCAGCTCGAGTGTGCCCAAGGTATAAATTCGGCCGGCCCTTCAACC
TGACCTTCAAATGGTTCGAGTCCCTCGGTGCCAACCACCTTTCATAATCAGACGCGGTCTTTTTTGAAC
ACCCAATACCGCACCTTCTGCCGCAACACCTTCGTGCTGTTCCCAAAGATCTTCCACCCAGCAAGTTCG
AACGCAAAACCGCCAATCACCAGACCAAGGCCATGCAAATGTGGCTATATGTGAAGGCTGTCAAAGCGG
TAACCGAGAGAGACATCTATGCGAAAAATACACCAGGTTCTGCCGACGAACGAACCTTGAACCTTACGAGCC
AGACGAACTTGTGCACCTCGCCAACCTACTTCTTCTTCCAACTCAAATCTTACACCTGTTACGAG
GATCTGCTGTCTGGGGGACTCATCAAAAAGATTAACACGGCCCGTACGAACAGCCGTAACCTCGATTCATCG
AGTCTTTCGCCGGCCGAATGACTTTAACAAGCTGATGGATGCCCTCAAGTGGGAGCCCTTACATACAC
GCTCGAGCCTGCCGTCTACAAAACCAAAGTGGGAAGCCATGTCAATCCACCAAACGATGGAGGCCACCGGC
CGAACCGAAAGCGCCGTACATAAGGGACCTGCTCGCCGCCACCAGAACCAGACCTCCTCCAACCTGAAG
ACCTTATCCCTACCGAACCGCCAACCTTCTTAGACACACCTGTTCCAAGGCTCAGCCGACTTACCCA
GCCACGCGCCGACCAACGAGATGCGGCACCAACCAGGCCGACAACCTGCGCGCACCCTGAAGACAGA
CAAGCCGGCGGTCCCGAACCCGAGCCTGAGCTGGAAACAACAACAACGCCAGCGCCACACCATCGACCT
TAGTCACTGAAGCAGCTGGCACAACCCCTTCCACCAGCCATCCACCCAAACCGAAGCCTTACTAGCAC
TGGGATGCCCCACGTCACCCAAGACCCGAACCCCATGCCGCAAAGCGTGTACTCCGACGAAGAAGAGCGA
CACAAAAGAGATCCCAACAAAATGTGCGTCTGCGCATCTGGCTGGTCACTGAACCTTTTTTTCGACCTGG
TACCAGGCTCTCTAGTCAACAAGCTGAAGACGAGAGACGCTTTCTTCTTCTCAACACGGCCAGACATCAC
ATACGGTCACGACAAGGTGTCTACGCGGGAACGACTGGCCCCTCGTTTTAACTGACTTCCCTACGCACA
GTGGGCTTCCAAGCCAATGGGGCACTCCTCCAAATTTACGCCAAGGGGCCAGGCATTCATGGCATAAAG
ACGACGAGCCCTGCTATGACGGGCAGCCATATTGACTTTGAACTTTGGTCAAGCTACTTTTCGAGTTTCAG
CAATGGAGTCAAGATGCCCTTAAAAGATGGGGAATATTTTGTGATGGCCGGCCATGGCTGAAACTCAA
CACCGAGTCAACAACTGCAGCTCCAACCGCATGTCTATCACCTTCCGCACCTCACACTCATACGATCTTTG
GCCACCCCTGCTGGAGACAGTGTGAACCCCAAACCAGAGGACAAACCAGTCCCGCTCCTGGCAACCA
AACCCCTCCAGCCCCCGCTCCAAGGAAACGCCACCGCCACAGTCCACGCACCAGGCAACTGACGACTCC
ACCTCCCCCTTTCAGGCAAACTAGCAACCGTACCCGCGGCCAGGCACCGCCCCACCCACAGACAGCCG
GCCACCAGATGGTGACTCTAACGAGCTTCCAAGAAAAATTTTTCCACTCACACCATGGAACGCCTG
GATTCCTTGTGAACGCCACGGTTTCAACGGTACAGAGCAACAGTTAAACCTGAAGGTTTCTCATA
ATTCCCATTAGTGAAGTGAAGCAGCTACCACACTGCCCTTCCCAGACACGGTGGCCAAAGCTACTACAG
AAAACCTGAAACGCATGCGCCGCTTCCCCACGCCACTCACCCTGCGAGCCAAACGGGCTGCAGCTACGC
CTCAGACGTCAAGAACAACCCGACGGGCAAACCTGAGCTCCATGGACCTCGCTTGGAAAGGCTAGCCTC
GCCTACAAGATGCAATTTGACGATCTCATACTCCCAGGGATTGTTATCCACGGTTGCGGTGGCTCCGGCA
AGTCGACAGATGATTCAGTCTTTTCATGGCGTCCCCCTTAGCTGAGGAAAACAACGTCACAGTCATCACACC
CACCGTTGAACTACGAAATGATTTGGCGACCAAGGTACCTAACGTTGTGGCGAAAATTTCAAACATTT
GAGAAGGCCATGATCCAGCCATGCAACTCCGTGGTGGTGTTCGACGACTACACCAAGCTGCCCCAGGAT
ACATCGAGGCGCTGCTGATGCACCACCGTAACGTTGATCTTTTCATCCTCACAGGTGACAGCCGGCAAG
TGTGTACCACGAGAGCAATTCAGAAGCTACATCTTACCCTTCCGAAGCCGTGGAGGTTTTTCGAGCCC
TACAGCGAATTTACGTCAACGCCACTCACCGAAATGTCACCGGGCTGGCCAACAACCTGGGAGTCTACT
CAGAAAGACAAGGAAGCTACGAGTTTCTTTCAGCACCCACCATCTCAAAGGCTCCCGCATACCCCTACT
TGTGCCCTTCAAACCTGAAGCGGAACGCTTTCTTGGACGTGGGCCATCGAACCATGACGTACGCCGGCTGC
CAAGGACTAACCGCACCGAAAAGTTCAAATCTTGTGGACAACCATAACCGAAATGTGCTCAGAGAGGGTAC
TCTACACCGCACTATCCAGGGCCGTCGACCAGATCCATTTTATAAACACAGGCCCTAACTCCTCTGACTG
GTGGGCTAAGCTTGTGAGTCGACCCCTACCTGAAGGCCCTTCAATTGACACCTACCGCGACGAACGCACTGAG

GCCCTGATTTCCGCACCCCGAGAACCACACCCCGCAGGTGCCCGCTCCTAAGACTCACTTTCCACCTG
CGCCAAAACACCTGTTAGAGCCTCTGGTTGCGTCACTCACGGACAAGGAGAGTAGGGAGCTATTCAACGA
AAACACCGGCATGAGCAACGCCATCCAAACGGAAGATCCAGTGGTGCAACTGTTTTCAACATCAACAGGCA
AAGGACGAGACTCTCTACTGGGCCACCATTGAAGCTAGACTCTCCATCTCAACCCCTGAGGCCAATGTGA
AGGAATTCGCCTTGAAACCGCAGCTCGGAGATGTGCTGTTTCGCCAACTACGCAAAAATATGCACCTGCC
AGATCAACCGGTGCCCTTCGACCCAAGAATGTGGGAGATCTCCGCCGCCGAGGTCAAGAATGTTTACCTC
AGCAAGCCTGTAGGGAACCTCGTCAACGCCGCCACTCGCCAAAGCCCAGACTTCCCCAGCGACAAGATCG
CACTGTTCTTGAAGTCCCAATGGGTCAAGAAGACAGAGAAGCTTGGGGTGTAAAAGTGAAGCCCAGGCA
GACCATCGCCTCATTCATGCAAGAGACTGTCATGCTCTACGGGACCATGGCCCGCTACCTCAGGAAGATG
CGAGCTCGTACCAGCAGACAACATATTCATCAACTGCGAGAAAACGCCCTGAGGACTTGAACGAGTTTG
TCAAGACTAGATGGAACCTTCAATGTACAAGCCCACCCAATGATTTACGGCTTTTCGACCAGTCACAGGA
TGGCGCCATGCTACAGTTTGAAGTCTTGAAGCTAAGTTCTTCAACGTTCCGGCCGACATCATCGAGGGT
TACATCACCATTAAAGTGAACGCCAAATATCTTCTCGGGACCCTAAGCATCATGCGGCTCTCCGGCGAAG
GCCCCACATTCGACGCCAACCCGAGTGTTCATCGCCTACAATGCCACGAGGTTCCATTTGGACGACTC
GGTGGCCCAAGTGTACGCCGGAGACGATATGGCCTTGGACCACAAAGTGCCGGAAAAAGCTAGCTTCATA
CGGCTGCAACAGAACTCAAGCTTACCTCCAAGCCACTTACCTACCAGACTCCCAGGACTCCCAGGACTACGCTG
AGTTCGCGGTTGGTCAATCACACCCGACGGAATCATGAAAGCCAGCCTCAAGATGCACGCCAGCATTGA
ACTTCAGAAAACGCATTAACAATTTCCATGAAAGCGCCGCTCCTACGCGCTAGATCTGAAGTATGCTTAC
GACATGGGCGATTTACTCCAGCACCATCTCACGGAAGCTGAAGCCGAATACCATGTCCAGTCGGTGGCGG
ACATGCACCTGGCTCATCAACAAGACGTACTCGTCAACGGCGCAGCTAGCCCCCAACAAGCCCAGTACA
CAGTGGCTCACAAGCGCGCAGCAGTTTCGTCACTAAACTTGTCCGCGAGTGCAAAGACCAAGGCCCGTAAT
GCCAGCAAGCGCCGTGCTAAGGTACGTGTGGTGGACCTCTCCACCAGACCTTCGCATAGCGGGGTTAAG
TTACCTTCGTTCTCGAAAATGGCTGTACCTCTTCTTCAAAAATTAATTTCTCGAGAACGAATTTCAAAGGAC
AGCCACCCCTCTCTACCCCATTAATCATCTTCGGCACTGCAGGTTCTGGGAAAAACAACCATCATTCGC
CTTCTTGCTGCCGCTTACCCGACCTGCACTTCTCCAGCTTCGACCTTGCCTCTCTCTTCAAACACCC
GCCGTTCAAAAGTTGCCGCAACCCGCTCACGCCACCCAGCTCCTAGACGAATTTCTCGCTGGGCGAA
CCCTGCTGTTTCTTAGCCAAGTTCTGCGACCCCTCCAATACAACAGCAGTGAATTTGCCGCTTCCGCAC
TACACTTCCAATCATACTACCGGTTCTGCCAGCCACCTGTGATCTCTTGAACCAGTTTTTCAGCACCA
CCCTTTCTCTCGTCTGCCAACCGCCGCTCGATCACTCGGCCGACCCGTACTCACAAGACCCCTTCTGG
GACCGTGGTTCGCTCTCGAACAGGACCTGCTCGACATCCTTAAACAACACGGCGCCTTTCCCAAGAAACCA
GCAGAGCTAACCGGCCAGACCTTGCCCGCGTTCGCTTCTACTGCTCTTCACTTCAAGACGCTTACGACG
CTGACCCGGCGGCCACCTTCATTGCCCTGACTCGCCATAACCACCAAGTTGGAGATCTTCGAGTTAGATGC
CAGGCTGACCCACCGCCTAACACGAGCACACTTTCAGATTATCGCCATTGGCTTCCATGTTGTGG
CATCATATACGCTTTTGGCGGACGAACCACGCGCTCCACACGGGAGACCAACAGCATTCTCTTCCCTTGGT
GGCATTACCAGGACGGCACGAAGCGAGTCATCTACAACCTACCCTCATAACCCGAATGTGAGATGCTCCA
AGCTCTTGGCCCTGGCGGGATCCTCGGGTGTGAGCCTTATCCTGGGCAATCAATGGTACTCTCGGCG
CTCTGTTACTCGTATTCACTTGTGTGCAATGCTCCAACGTACCACCATCCCTGTAGAGTGGTCAATTC
CGGACACACTATTACAATCACCGATTGCCCGAATGCAGCTGAAATTTCTGCGTGGTCTCGATGTCGCCCC
TGGAACGGGGTTAAGTTTCTCAATTTGTGAAAATTTGAGAATTTCCCTTTCAACATACCAGGGGAACCC
CACAAGCTGACATCGACGTATAAAATCCCGGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC
CGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCAGGGTTTTGTTAAGTTTTCCCTTTTACTCGAAAG
ATGGGTACCCCTCAAGCAGTCAACACCCCGGTCAACAACCCGCCAGGCCAGCCAGTTCTCCAGCGTC
CTCCAGTAACTCTTCCGTTCCAACCTCGCCGACCCAAACCGCGCACCTTCCATGGAAGACCTCGCCCA
GGTCAAATATGTGCTTCTCTCTCCGCGTCCGCAACCCCGCCAAATCACCAAACCTCGGAGTGGTTT
GTCAAAGTTCGGCATCGAACCCAACTCCACTGGACCTGCCATGTGGGACCTCGCCCGCGCTTACGCTGACG
TGCAGGCTAGCCGTTCCGCCATGCTCACCGGAGCATCGGCTGCTGACCCCAACGCTCTCAAGACAGTCCCT
CGCGAGACAACCTTGACGCAGTCTTCTCACCCGAGACAATTTGCAATGTACTTTCGCAAAAAGTCGTGTGG
AACATCCTACTCACTACGCAAGTCTCTCCAGCTAGCTGGGCAAAAACCTCGGATACTCTACGATTGCCGGT
TCGCCGCTTTCGACTTCTTCGACGGAGTGTCAACCCAGCCGCCCTGGACCCAGCTGACGGCTCGTCAG
GCAACCCAGCCACGGGAAAATCCAAGCTCACCAAGTTGCCAAGTCTGCCCTACTCGCTAGACAAAGAATC
TCCGAAGGCAACTTCGTCTCCAGCTCTCCGATGTACCCACGGTCCGATAGGCGGCATCAACTCCATGT
ACGCGATCGAAGCGCCACCCGAATTTTAAATACTCTTGCCTTAAATAAGGAGGTGGTTTTCTACAG
TTTTTTTTTCCACTTACGCTTTCTAGCGTAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAACGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTATTTTTCTCCATAAAT
AATGTGTGAGTAGTTTTCCCGATAAGGGAAATTAGGGTTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATAT
AAGAAAACCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCATAAACCA
AAATCCAGTTCAGGAGACGGGACAAGGATGCGAGCTAGCCTGCAGGAATGTTGATTTTGTGATGACTGA
TGGCAGGATATATGCGGTTGTAATTCATTTTTATTTGCTAAATTTCTGTATTTGTTGTTGTTGTTGCGGTTG
TAAATTTTTTTGGAAGAACAAGAAAAAGAAAAACACCCGTTAGGGTGTTTTTTAGTTAGTGTGGCGCGCCG
ACTTGCACATGCGGCTCTTTGCAATCAACTATTAGAAAAATTCATCCAGCATCAGATGAAATTCAGTT
TGTTCAATCCGATTATCAATGCCATATTTCTGAAACAGACGTTTTTTCAGGCTCGGGCTAAATTCGCC

CAGGCAGTTCACAGAATGGCCAGATCCTGATAACGATCCGCAATGCCACACGGCCACATCAATGCAG
 CCAATCAGTTTGCTTCATCGAAAATCAGGTTATCCAGGCTAAAATCGCCGTGGGTACCACGCTATCCG
 GGCTAAACGGCAGCAGTTTATGCATTTCTTTCCACACCTGTTCCACCGGCCAGCCGTTACGTTTCATCATC
 AAAATCGCTCGCATCCACCAGGCCGTTGTTTCATACGGCTCTGCGCTGGGCCAGACGAAACACACGATCG
 CTGTTAAACGGGCAGTTGCACACCCGGAATGCTATGCAGACGACGCAGAAACACGGCCAGCGCATCCACAA
 TGTTTTCGCCGCTATCCGGATATTCCTCCAGCACCTGAAACGCGGTTTTTGCCCGGAATCGCGGTGGTCAG
 CAGCCACGCATCATCCGGGTGCGAATAAAATGTTTAAATGGTCGGCAGCGGCATAAAATTCGGTCAGCCAG
 TTCAGACGCACCATTTTCATCGGTACATCGTTCCGACGCTGCCCTTTGCCATGTTTCAGAAACAGTTCCG
 GCGCATCCGGTTTTGCCATACAGACGATAAAATGGTCGCGCCGCTCTGACCCAGCTTATCACGCGCCCATTT
 ATAGCCATACAGATCCGCATCCATGTTGCTGTTTCAGACGCGGACGGCTACAGCTCGTTTTACGCTGAATA
 TGGCTCATAACACCCCTTGATTTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTT
 TATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTTGAGACACAAGATCGGATTGGCGGTTATGCGGTTCTACCGG
 CGCGGCAGCGTTACCCGTGTCGGCGGCTCCAACGGCTCGCCATCGTCCAGAAAACACGGCTCATCGGGCA
 TCGGCAGGCGCTGCTGCCCGCGCCGTTCCCATTCCTCCGTTTCGGTCAAGGCTGGCAGGTCTGGTTCCAT
 GCCCAGAAATGCCGGCTGGCTGGGCGGCTCCTCGCCGGGGCCGGTCGGTAGTTGCTGCTCGCCCGGATAC
 AGGGTCGGGATGCGGCGCAGGTCGCCATGCCCAACAGCGATTCGTCTGGTCGTGATCAACCACCA
 CGGCGGCACTGAACACCGACAGGCGCAACTGGTCGCGGGGCTGGCCCCACGCCACGCGGTTCATTGACCAC
 GTAGGCCGACACGGTGCCGGGGCCGTTGAGCTTACGACGGAGATCCAGCGCTCGGCCACCAAGTCTTG
 ACTGCGTATTGGACCGTCCGCAAAAGACGTCGGATGAGCTTGGAAAGTGTCTTCTGGCTGACCACCACGG
 CGTTCCTGGTGGCCCATCTGCGCCACGAGGTGATGCAGCAGCATTGCCGCGTGGGTTTTCTCGCAATAAG
 CCCGGCCCACGCCTCATGCGCTTTGCGTTCGTTTGCACCCAGTGACCGGGCTTGTCTTGGCTTGAATG
 CCGATTTCTCTGGACTGCGTGGCCATGCTTATCTCCATGCGGTAGGGGTGCCGCACGGTTGCGGCACCAT
 GCGCAATCAGCTGCAACTTTTCGGCAGCGCGACAACAATTATGCGTTGCGTAAAAGTGGCAGTCAATTAC
 AGATTTTCTTTAACCTACGCAATGAGCTATTGCGGGGGGTGCCGCAATGAGCTGTTGCGTACCCCCCTTT
 TTTAAGTTGTTGATTTTAAAGTCTTTTCGCAATTCGCCCTATATCTAGTTCTTTGGTGCCTAAAGAAGGGC
 ACCCTCGGGGTTCCCCACGCCTTCGGCCTTGCCCAAGTGGCGCTGCCCTTGGAACCCCGCATCGCCG
 GTTGATCGACTGCGCGGCTTCGGCTTGCCCAAGTGGCGCTGCCCTTGGAACCCCGCATCGCCG
 CCGTGAGGCTCGGGGGGCGAGGCGGGCGGGCTTCGCCCTTCGACTGCCCCACTCGCATAGGCTTGGGTGCG
 TTCCAGGCGCGTCAAGGCCAAGCCGCTGCGCGGTGCGTGCAGGAGCCTTGACCCGCTTCCACTTGGTGT
 CCAACCGGCAAGCGAAGCGCGCAGGCCGCGAGGCCGAGGCTTTTCCCCAGAGAAAATTAATAAATTTGAT
 GGGGCAAGGCCGAGGCCGCGCAGTTGGAGCCGGTGGGTATGTGGTCAAGGCTGGGTAGCCGGTGGGCA
 ATCCCTGTGGTCAAGCTCGTGGGCAGGCGCAGCCTGTCCATCAGCTTGTCCAGCAGGGTTGTCCACGGGC
 CGAGCGAAGCGAGCCAGCCGGTGGCCGCTCGCGGCCATCGTCCACATATCCACGGGCTGGCAAGGGAGCG
 CAGCGACCGCGCAGGGCGAAGCCCGGAGAGCAAGCCCGTAGGGGCCATCATCAGTTCGGTGGTCTTCCG
 ACGAACAATAAGCCGCAATCGCGCCTTTTTTATTGATAACAAAACCGGCTCAGTTCGCGTAGAAAC
 CAACATGCAAGCTCCACCGGTGCAAAGCGGCAGCGG**CGGCAGGATATATTCAATTGTAAT**GGCTTCAT
 GTCCGGGAAATCTA**CTGGTGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAA**TGGAGAAAAAGATTAATTAAGTACT
 AGTAGCCTGGTTCGAAACCGTCTCA

Secuencia del plásmido pLBLEVX-sgRNA construido. **Promotor** (inicio de transcripción sobre fondo amarillo) y **terminador** (sitio de procesamiento y poliadenilación subrayado) 35S del CaMV en rojo y fucsia, respectivamente. Cola **poliA** (50 nt). **sgRNA** subrayado en gris, con el **crRNA** en negrita. Doble **LB** y **RB** sobre fondos amarillo y rojo, respectivamente. **Resistencia a kanamicina** (50 µg/ml) y **origen pBBR1** con número de copias medio.