

Explorando estrategias de edición génica para promover el reemplazo alélico en soja

Tesis de maestría 2024 - Posgrado en Biotecnología

Laboratorio Biología Molecular Vegetal

María Pía Coronel

Directora: Dra. Andrea Luciana Fleitas

Codirectora: Dra. Sabina Vidal



Contenidos

Agradecimientos	3
Abreviaciones	4
Resumen	7
Introducción.....	9
Mejoramiento genético	9
Transgénesis	10
Edición génica y <i>CRISPR</i> convencional	12
<i>Gene targeting</i>	15
<i>Base editing</i> y <i>prime editing</i>	17
Edición génica en el cultivo de soja.....	19
Antecedentes del proyecto	20
Hipótesis	23
Objetivos.....	23
Materiales y métodos	24
1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	24
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
1.2. <i>Nicotiana benthamiana</i>	24
2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	24
2.1 <i>Escherichia coli</i>	24
2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
2.3 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	25
3. Extracción de ADN genómico de líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> y <i>hairy-roots</i> de soja	25
4. Análisis de presencia del transgén en líneas de <i>A. thaliana</i> mediante PCR.....	26
5. Extracción de ARN de <i>A. thaliana</i> y síntesis de ADNc para análisis de expresión por RT-PCR	26
6. Análisis de expresión de líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> mediante RT-PCR	27
7. Ensayo de sensibilidad de líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> al herbicida glifosato	27
8. Ensayo de rendimiento de líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> frente al herbicida glifosato	28
9. Análisis estadístico de ensayo de rendimiento de líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> frente al herbicida glifosato	28
10. Diseño y evaluación <i>in vitro</i> de <i>SgRNAs</i>	28
11. Generación de vectores	29
11.1 Generación de vector binario pUB-Dest:EPSPS1 _{CDS} -WT, TIPS o TIPA	29

11.2 Generación de vectores multipropósito PiLuCasRED_GW/AS para edición génica mediante el sistema <i>CRISPR/Cas9</i>	29
11.3 Generación de vectores multipropósito PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS _{TIPSKK} para reemplazo alélico.....	30
12. Transformación de plantas.....	31
12.1 Transformación de <i>A. thaliana</i>	31
12.2 Agroinfiltración de <i>N. benthamiana</i>	31
12.3 Transformación de cotiledones de soja mediante <i>A. rhizogenes</i> para la generación de <i>hairy-roots</i>	31
13 Genotipado de <i>hairy-roots</i> de soja	32
Resultados	33
Caracterización de las variantes TIPS y TIPA de la EPSPS1 de soja en <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
1. Análisis fenotípicos de líneas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
Desarrollo de herramientas para edición génica en soja	36
1. Generación de vectores multipropósito PiLuCasRED_AS/GW para edición génica mediante el sistema <i>CRISPR/Cas9</i>	36
2. Evaluación de los vectores PiLuCasRED_AS/GW en sistemas de expresión transitoria.....	41
3. Transformación y edición génica del gen <i>EPSPS1</i> con el vector PiLuCasRED_AS_TA1 en <i>hairy-roots</i> de soja	42
4. Generación de vectores multipropósito PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS _{TIPSKK} para reemplazo alélico en soja	44
Discusión.....	48
1. Caracterización de los mutantes TIPS y TIPA de la EPSPS1 de soja en <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
2. Desarrollo de herramientas para edición génica en soja	50
Bibliografía.....	57
Anexo.....	65
1. Secuencia del fragmento sintetizado y clonado en el vector pUC57 por la empresa Macrogen.....	65
2. Secuencia del vector multipropósito PiLuCasRED_AS	65
3. Secuencia del vector multipropósito PiLuCasRED_GW	69
4. Secuencia de molde de reemplazo (EPSPSTIPS-KK).....	72
5. Secuencia completa del vector multipropósito PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS _{TIPSKK}	73
6. Secuencia genómica del gen <i>EPSPS1</i> (Glyma.01G139600) de <i>Glycine max</i> y con respectivos <i>primers</i> utilizados para genotipado	77

Agradecimientos

En primera instancia quiero agradecer a mis tutoras, *Luciana* y *Sabina*, por permitir unirme al equipo de BMV en 2019 y acompañarme y guiarme durante mi tesis de grado y mi maestría. Estoy muy agradecida del apoyo emocional y confianza que me han dado, además del aprendizaje y el conocimiento durante este proceso de varios años.

También quiero agradecer a todos los que han formado parte del laboratorio y que me han dado una mano enorme en este camino, ya sea en lo académico como también a nivel personal. El proceso de investigación puede ser, por momentos, abrumador y la buena energía y motivación fueron un pilar importante para llegar a dar este cierre.

A *Wayne Parrott, Tim Chappell, Vincent Pennetti, Eudald Illa Berenguer, Pete LaFayette, Lauren McDaniel* y todos los miembros con los que compartí en el *ParrottLab* y *IPBGG* en *University of Georgia*. La pasantía en UGA fue fundamental en el proceso de aprendizaje de *hairy-roots* y genotipado. Especialmente quiero agradecer a *Tim, Vincent* y *Eudald* por haberme enseñado y tutorado durante esos meses.

A mi familia, mis padres y mi hermano, por haberme acompañado desde el otro lado. Ustedes más que nadie saben el esfuerzo y empeño que he volcado en este proceso. Les agradezco por el cariño y las palabras de motivación, a pesar de no entender mucho de este mundo molecular.

A *Jason*, quien estuvo cada día acompañándome y que agradezco haber conocido, casi milagrosamente, en esa pasantía. Thank you.

A *Luli*, quien además de estar a mi lado en todo desde 2008, fue fundamental en el diseño de esta tesis, quien continúa compartiendo su talento conmigo. También quiero agradecer a todas mis amigas y amigos, de la vida y de la facultad, quienes también me han dado muchísimo apoyo desde siempre.

Finalmente, quiero agradecer a la *Dra. Martina Crispo, Dra. Inés Ponce de León* y *Dr. Ignacio López* por haber aceptado ser parte del tribunal de esta tesis.

A las Agencias financiadoras; ANII Programa de Movilidad e Intercambios Académicos (MIA), Comisión Académica de Posgrados (*Beca de Maestría* y *Beca de Finalización de Maestría*), Fondo María Viñas de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación ("*Optimización de las técnicas de edición genómica libres de ADN utilizando un modelo de resistencia a herbicida*", FMV_3_2018_1_148011) y CSIC Grupos ("*Desarrollo de herramientas basadas en ingeniería genética de precisión para contribuir al mejoramiento genético de las plantas*", Grupo CSIC 1492).

Abreviaciones

ABE	<i><u>A</u>denine <u>B</u>ase <u>E</u>ditors</i>
ADN	<i><u>Á</u>cido <u>D</u>esoxirribo<u>n</u>ucleico</i>
ADNc	<i><u>A</u>DN <u>C</u>omplementario</i>
BE	<i><u>B</u>ase <u>E</u>dit<u>ing</u></i>
BeYDV	<i><u>B</u>ean <u>Y</u>ellow <u>D</u>warf <u>V</u>irus</i>
Bp	<i><u>B</u>ase <u>P</u>air</i>
BrET	<i><u>B</u>romuro de <u>e</u>tidio</i>
Cas9	<i><u>C</u>RISPR <u>a</u>sociated <u>9</u></i>
CBE	<i><u>C</u>ytosine <u>B</u>ase <u>E</u>ditors</i>
CDS	<i><u>C</u>oding <u>S</u>equ<u>e</u>nce</i>
CGBE	<i><u>C</u>-to-<u>G</u> <u>B</u>ase <u>E</u>ditor</i>
CRISPR	<i><u>C</u>lustered <u>R</u>egularly <u>I</u>nterspaced <u>S</u>hort <u>P</u>alindromic <u>R</u>epeats</i>
cr-RNA	<i><u>C</u>RISPR ARN</i>
DEPC	<i><u>D</u>i<u>e</u>t<u>i</u>l<u>p</u>iro<u>c</u>arbonato</i>
DO	<i><u>D</u>ensidad <u>Ó</u>ptica</i>
DSB	<i><u>D</u>ouble <u>S</u>trand <u>B</u>reak</i>
EDTA	<i><u>E</u>thylene<u>d</u>iamine<u>t</u>etraacetic <u>a</u>cid</i>
EPSP	5-enolpiruvatoshikimato-3-fosfato
EPSPS	5-enolpiruvatoshikimato-3-fosfato sintasa
EtOH	<i>Ethanol</i>
Fw	<i><u>F</u>or<u>w</u>ard</i>

FDA	<i><u>F</u>ood and <u>D</u>rug <u>A</u>dministration</i>
GT	<i><u>G</u>ene <u>T</u>argeting</i>
HR	<i><u>H</u>omologous <u>R</u>ecombination</i>
HRG	<i><u>H</u>airy <u>R</u>oot <u>G</u>rowth</i>
ISAAA	<i><u>I</u>nternational <u>S</u>ervice for the <u>A</u>cquisition of <u>A</u>gri-biotech <u>A</u>pplications</i>
KI	<i><u>K</u>nock <u>I</u>n</i>
KO	<i><u>K</u>nock <u>O</u>ut</i>
LB	<i><u>L</u>eft <u>B</u>order</i>
LiCl	<i><u>L</u>ithium <u>C</u>hloride</i>
MGAP	<i><u>M</u>inisterio de <u>G</u>anadería <u>A</u>gricultura y <u>P</u>esca</i>
MPM	<i><u>M</u>arcador de <u>P</u>eso <u>M</u>olecular</i>
N ₂	<i><u>N</u>itrógeno líquido</i>
NaAc	<i><u>S</u>odium acetate</i>
NHEJ	<i><u>N</u>on <u>H</u>omologous <u>E</u>nd <u>J</u>oining</i>
OGM	<i><u>O</u>rganismo <u>G</u>enéticamente <u>M</u>odificado</i>
ON	<i><u>O</u>ver <u>N</u>ight</i>
PAM	<i><u>P</u>rotospacer <u>A</u>djacent <u>M</u>otif</i>
PBS	<i><u>P</u>rimer <u>B</u>inding <u>S</u>equence</i>
PCR	<i><u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction</i>
PE	<i><u>P</u>rime <u>E</u>editing</i>
pegRNA	<i><u>P</u>rime <u>e</u>ditinq <u>R</u>NA</i>
PEP	<i><u>P</u>hospho<u>e</u>no<u>l</u>pyruvate</i>

RB	<i><u>R</u>ight <u>B</u>order</i>
RFP	<i><u>R</u>ed <u>F</u>luorescent <u>P</u>rotein</i>
RGEN	<i><u>R</u>NA <u>G</u>uided <u>E</u>ndon<u>u</u>cleases</i>
RNA	<i><u>R</u>ibonucleic <u>A</u>cid</i>
RT	<i><u>R</u>oom <u>T</u>emperature</i>
RT-PCR	<i><u>R</u>everse <u>T</u>ranscription <u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction</i>
Rv	<i><u>R</u>e<u>v</u>erse</i>
S3P	<i><u>S</u>hikimate-<u>3</u>-<u>P</u>hosphate</i>
SgRNA	<i><u>S</u>ingle <u>G</u>uide <u>R</u>NA</i>
TA	<i><u>T</u>arget <u>A</u>daptor</i>
TALEN	<i><u>T</u>ranscription <u>A</u>ctivator-<u>l</u>ike <u>E</u>ffector <u>N</u>ucleases</i>
T-DNA	<i><u>T</u>ransfer DNA</i>
TIPA	<i><u>T</u>hr102<u>I</u>le + <u>P</u>ro106-<u>A</u>la</i>
TIPS	<i><u>T</u>hr102<u>I</u>le + <u>P</u>ro106-<u>S</u>er</i>
tracrRNA	<i><u>T</u>rans-activating <u>C</u>RISPR RNA</i>
UV	<i><u>U</u>ltravio<u>l</u>et</i>
WT	<i><u>W</u>ild <u>T</u>ype</i>
ZFN	<i><u>Z</u>inc-<u>f</u>inger <u>N</u>ucleases</i>

Resumen

La soja es uno de los cultivos más relevantes para Uruguay, siendo el que mayor superficie de siembra ocupa y encabezando desde hace más de 20 años el rubro exportaciones. El déficit hídrico y otros factores de estrés afectan la productividad de este cultivo, la cual suele ser menor en Uruguay que la reportada para otros países de la región.

Las nuevas tecnologías de edición génica han demostrado un enorme potencial para contribuir al mejoramiento genético de los cultivos. Estas tecnologías, principalmente las basadas en el sistema *CRISPR/Cas*, pueden utilizarse para introducir mutaciones en sitios específicos del genoma. Las mutaciones ocurren como resultado de la reparación de un corte a nivel de la doble hebra del ADN, generado específicamente por el sistema de edición génica. Los mecanismos de reparación del ADN incluyen aquellos que involucran la unión de extremos libres no homólogos (*NHEJ*), que predominan en células somáticas, o aquellos que dependen de la recombinación homóloga (*HR*), que operan principalmente en células sexuales mientras que suelen ser poco eficientes en células somáticas.

El objetivo general de este trabajo es optimizar metodologías de edición génica basadas en *HR* en soja (*Glycine max*), con el fin de generar plantas editadas mediante reemplazo alélico utilizando el sistema *CRISPR/Cas9*. Para facilitar la selección de eventos editados mediante *HR*, se utilizó un modelo de resistencia a herbicida a fin de proporcionar un fenotipo fácil de identificar. En concreto, el abordaje experimental propuesto consistió en reemplazar un gen que codifica para 5-enolpiruvatoshikimato-3-fosfato sintasa (*EPSPS*), por una versión mutada del gen que codifica una enzima insensible al herbicida glifosato.

Con ese objetivo, en este trabajo se buscó determinar si las mutaciones TIPS (Thr102-Ile + Pro106-Ser) o TIPA (Thr102Ile + Pro106-Ala) en la proteína codificada por el gen *EPSPS1* de soja, confieren insensibilidad al herbicida glifosato. Para ello, se analizaron los niveles de expresión mediante RT-PCR semicuantitativo de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, expresando una versión de la proteína conteniendo las mutaciones TIPS o TIPA. Posteriormente, se hicieron ensayos fenotípicos para evaluar la sensibilidad y el rendimiento de las plantas transgénicas tratadas con el herbicida glifosato. En segundo lugar, se generó una serie de vectores multipropósito (serie PiLuCas) para transformar raíces de soja de forma transitoria mediante *Agrobacterium rhizogenes* y de esa manera evaluar la factibilidad y eficiencia de obtención de eventos de reemplazo alélico.

En el futuro se buscará iniciar el proceso para determinar la factibilidad, eficiencia y heredabilidad de eventos de reemplazo alélico en plantas enteras, mediante la introducción del sistema *CRISPR/Cas9* en cotiledones de soja mediante la transformación estable por *Agrobacterium tumefaciens*.

Introducción

Mejoramiento genético

A partir del siglo XX, la agricultura ha experimentado una transformación significativa como resultado de la expansión científica (*Chawla et al., 2023*). Desde la “Revolución Verde”, cuyo objetivo fue aumentar el rendimiento de los cultivos mediante el uso de variedades de alto rendimiento, hasta la más reciente “Revolución Genómica”, que aprovecha las últimas herramientas biotecnológicas para crear cultivos más resistentes a la inestabilidad ambiental, el mejoramiento genético ha estado evolucionando constantemente (*Chawla et al., 2023*). Este mejoramiento se ha enfocado en el desarrollo de cultivos con mejores rendimientos, calidad nutricional y tolerancia al estrés biótico y abiótico (*Abdul Aziz et al., 2022*).

La gran cantidad de desarrollos biotecnológicos en el campo de la biología vegetal de los cultivos, ha permitido el desarrollo de plantas modificadas con rasgos deseados para la producción de alimentos. Por su parte, el uso de la transgénesis ha impulsado la introducción de secuencias genéticas foráneas, así como el silenciamiento o la sobreexpresión de genes específicos de origen vegetal (*Abdul Aziz et al., 2022*). Asimismo, la combinación con herramientas “ómicas”, el fenotipado de alto rendimiento y el avance generacional, han permitido acelerar significativamente los programas de mejoramiento genético de cultivos (*Ahmar et al., 2020*).

En la historia del mejoramiento vegetal se han utilizado distintas técnicas para la manipulación genética de los cultivos, que incluyen; el cruzamiento asistido, la mutagénesis al azar, la transgénesis y, más recientemente, la edición génica. El mejoramiento convencional (por cruzamientos), que implica el cruce selectivo de plantas para combinar rasgos deseables mediante recombinación sexual, ha desempeñado un rol clave en la mejora de la productividad agrícola (*Gao, 2021*). Sin embargo, el cruzamiento sólo puede utilizarse para introducir rasgos que ya están presentes en los genomas parentales de plantas sexualmente compatibles. En ese contexto, la baja variabilidad genética en los germoplasmas puede limitar el potencial de este abordaje y puede demandar el uso de estrategias que permitan incrementar la variabilidad genética disponible para el mejoramiento de una especie en particular (*Gao, 2021*).

En el mejoramiento por mutagénesis al azar, se utilizan compuestos químicos o radiación para generar mutaciones aleatorias en el genoma para incrementar la variación genética. En esos casos, una vez generadas las mutaciones se deben identificar los individuos que efectivamente poseen rasgos deseados, lo cual puede ser difícil, sobre todo en plantas con genomas grandes (*Gao, 2021*). Dado

que, en estos casos, los cambios nucleotídicos se producen al azar, se trata de una metodología no dirigida (*Jung & Till, 2021*).

Los avances en ingeniería genética a través de metodologías, como el ADN recombinante y la transgénesis, permitieron elaborar metodologías de mayor precisión facilitando la transferencia de secuencias genéticas específicas que pueden provenir de un organismo de la misma especie o de especies no relacionadas. Aun siendo más dirigida, la transgénesis es una herramienta complementaria para mejoramiento genético y normalmente es combinada con las técnicas de mejoramiento convencionales para el desarrollo de variedades comerciales (*Visarada et al., 2009*).

Esta herramienta ha sido utilizada para producir alimentos genéticamente modificados con el objetivo de reducir la escasez, mejorando el rendimiento y facilitando la producción extensiva, reduciendo los costos de transporte y mejorando el valor nutricional de algunos cultivos (*Jhansi & Usha, 2013*). Las variedades de cultivos genéticamente modificadas pueden beneficiar tanto al sistema de cultivo de grandes superficies como a los pequeños productores a lo largo del mundo, con el apoyo e implementación de políticas nacionales complementarias, políticas biotecnológicas, protegiendo el comercio nacional y el medio ambiente (*Visarada et al., 2009*).

En la literatura existen numerosos trabajos en los que se usa la transgénesis para modificar genéticamente distintas plantas y cultivos. Sin embargo, son pocos los ejemplos de cultivos transgénicos que han alcanzado la etapa comercial. En la próxima sección se discutirá más en profundidad acerca de los transgénicos, sus aplicaciones, limitaciones y aspectos regulatorios.

Transgénesis

Las primeras plantas transgénicas (tabaco y petunia resistentes a antibióticos) fueron creadas en 1983 (*Raman, 2017*). Posteriormente, en 1990, China se convirtió en el primer país en comercializar tabaco transgénico para la resistencia a los virus (*Raman, 2017*). En 1994, el tomate “*Flavour Saver*” (Calgene, EE. UU) se convirtió en el primer cultivo transgénico habilitado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). El tomate “*Flavour Saver*” fue modificado genéticamente con el objetivo de retrasar la maduración y conferir resistencia a putrefacción añadiendo un transcrito antisentido del gen de poligalacturonasa (*Redenbaugh et al., 1992*). Desde la década de los 90s, varios cultivos transgénicos han sido aprobados para la producción y consumo humano a gran escala, entre ellos los de mayor producción son la soja *Roundup Ready* con resistencia al herbicida glifosato, el maíz con toxina Bt para la protección frente a insectos y el algodón con resistencia al herbicida bromoxinilo (*Raman,*

2017). Según *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA)* actualmente se encuentran 577 eventos transgénicos aprobados de los cuales 291 fueron diseñados para resistencia a herbicidas (50 %) (ISAAA, 2024). En contraposición, solo 12 eventos aprobados están modificados para mejorar la tolerancia a la sequía (0.02 %); 7 en maíz, todos ellos con la introducción del gen *cspB* (*cold shock protein*) de *Bacillus subtilis*, 2 en soja y uno en trigo, modificados para expresar el factor de transcripción *Hahb-4* de girasol, y 3 en caña de azúcar, los cuales expresan un gen de deshidrogenasa de colina de *Escherichia coli* (*EcBetA*) o de *Rhizobium meliloti* (*RmBetA*), el cual aumenta la producción de glicina betaína, un osmoprotector (ISAAA, 2024).

Entre el año 2019 y 2021, veintiséis países cultivaron alrededor de 190 millones de hectáreas de cultivos biotecnológicos, divididos casi por igual entre veintiún países en desarrollo y cinco países desarrollados (Estados Unidos, Canadá, Australia, España y Portugal) donde se cultiva aproximadamente el 46 % del total de cultivos transgénicos. Del aproximadamente 54 % cultivado por los países en desarrollo, Brasil, Argentina e India se encuentran entre los cinco países con la mayor superficie cultivada (Turnbull et al., 2021).

A pesar de los aspectos positivos que ha traído la transgénesis a la industria y a la biotecnología, esta técnica posee una serie de desventajas. La inserción de alelos mediante las diversas técnicas de transformación es un proceso largo, técnicamente complejo y costoso. Los protocolos de transformación, en general dependen de la respuesta al cultivo de tejidos de una especie (inducción y regeneración de callos o brotes) y existen solo algunos genotipos que son susceptibles. Los métodos de transformación que se diseñaron *in planta*, sin la necesidad de pasar por cultivo de tejidos, se ven igualmente limitados a ciertas especies (por ejemplo; *Arabidopsis thaliana*, o *Medicago truncatula*) y aún no se ha podido llevar dichas técnicas al mismo nivel para otros cultivos de tejidos vegetales (Visarada et al., 2009).

Las dos metodologías más empleadas para introducir las construcciones génicas en las células de las plantas son la transformación mediada por *Agrobacterium* (Li et al., 2017) o mediante el bombardeo de partículas (biolística, Finer, 2016). Ambos métodos tienen algunos inconvenientes que pueden limitar el éxito del abordaje. La transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* está limitada por el genotipo de la especie y la susceptibilidad del explante a ser infectado por esta bacteria. En el caso de la biolística, es frecuente que se genere daño celular que luego afecta la regeneración y además de las altas probabilidades de inserción de fragmentos no deseados de la construcción o de múltiples copias del transgén (Su et al., 2023). Estos aspectos pueden contribuir a que los organismos transgénicos estén

sujetos a estrictas regulaciones gubernamentales, que encarecen su liberación en el mercado y siembran preocupación en la opinión pública acerca de su bioseguridad (Gao, 2021).

Edición génica y *CRISPR* convencional

Las tecnologías de edición de genes permiten modificar de manera muy precisa los genomas generando nuevos rasgos al alterar los genes existentes. Estas metodologías permiten producir mutaciones nulas (de tipo *knock-out*, *KO*), o incrementar o reducir los niveles de expresión de genes, insertando o eliminando secuencias específicas en sitios definidos (de tipo *knock-in* -*KI*- o *gene targeting*, no al azar), entre otras posibilidades (Ahmad et al., 2023). Desde el año 2010 se han liberado comercialmente algunos cultivos y otros organismos editados, los cuales se vieron sujetos a procesos regulatorios y de evaluación, más sencillos que los que deben atravesar los organismos transgénicos (Kuzma, 2016). Ejemplos de estos organismos editados liberados comercialmente son un champiñón resistente a la oxidación, soja con mayor contenido de ácido oleico, canola resistente al herbicida sulfonilurea, maíz con mayor contenido de amilopectina, entre otros (Turnbull et al., 2021). Aunque en muchos países continúa en debate si estos cultivos deben estar sujetos a procesos regulatorios similares a los organismos transgénicos, en varios países se ha optado por considerarlos como no-transgénicos (Turnbull et al., 2021). En el caso de Uruguay, se redactó un decreto en marzo de 2024 estableciendo los procedimientos para la evaluación de productos y derivados de eventos editados (MGAP - Ministerio de Ganadería, 2024). La clasificación de los cultivos editados como cultivos transgénicos tradicionales, podría afectar enormemente su desarrollo, por lo que el avance científico en este sentido depende de la regulación que se tome a futuro (Ahmad et al., 2023).

Los sistemas de edición génica pueden clasificarse en dos grandes grupos en base a la naturaleza de la molécula que participa en el reconocimiento de la secuencia blanco en el ADN. Por un lado, están los sistemas basados en proteínas quiméricas sintéticas, capaces de reconocer y efectuar un corte en una secuencia blanco. Por otro lado, están los sistemas basados en complejos ARN-proteínas (*RGENs*, *RNA Guided Endonucleases*), en los cuales la molécula de ARN cumple la función de reconocimiento específico de la secuencia blanco (Khan, 2019). Dentro de los sistemas basados en proteínas, encontramos las nucleasas de dedos de zinc (*ZFNs*), las nucleasas con efectores de tipo activadores de transcripción (*Transcription Activator-like Effector Nucleases*, *TALENs*) y las meganucleasas. Las *ZFNs* y las *TALENs* utilizan dominios proteicos de unión al ADN presente en factores de transcripción de plantas o de

bacterias fitopatógenas, combinados de forma tal que la proteína sintética puede ser programada para reconocer una determinada secuencia específica en el ADN (Khan, 2019).

Dentro de los sistemas de edición génica, el sistema *CRISPR/Cas* (*Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein*) es la incorporación más reciente. Los sistemas *CRISPR/Cas* se clasifican en los de Clase 1 y Clase 2, y 6 tipos (I-VI). Los sistemas *CRISPR* de tipo II (Clase 2), incluyen los sistemas que utilizan proteínas nucleasas como Cas9 (Csn1), Cas12a (Cpf1), Cas13a (C2c2) y Cas13b (C2c6), siendo las más utilizadas la Cas9 y Cas12a (Makarova et al., 2018). La Cas9 más frecuente es la *SpCas9* (proveniente de *Streptococcus pyogenes*), aunque en la actualidad se han incorporado Cas9 provenientes de otras bacterias (*Staphylococcus aureus* -*SaCas9*-, *Streptococcus thermophilus* -*StCas9*-, *Neisseria meningitidis* -*NmCas9*-, por mencionar algunas) (Xu & Zhanjun, 2020). En las bacterias, el sistema *CRISPR* tipo II proporciona protección contra fagos y plásmidos invasores mediante el corte del ADN por nucleasas Cas guiadas por pequeños *crispr* ARNs (Gaj et al., 2016). Existe una diversidad de pequeños ARNs, pero cuando se utiliza el sistema *CRISPR/Cas9*, los guías son el *crispr* ARN (*crRNA*) y el ARN transactivador (*transactivating crispr RNA*, *tracrRNA*), y en muchos casos, éstos pueden ser reemplazados por una única molécula sintética llamada *SgRNA* o *Single guide RNA*. Desde los primeros reportes acerca del sistema *CRISPR*, la ingeniería genética ha permitido expandir sus posibles aplicaciones, desarrollando un número importante de versiones de proteínas Cas (Makarova et al., 2018), incrementando información acerca de promotores para estas proteínas y para los ARN guías (Ma et al., 2016), optimizando metodologías de clonado (Liu et al., 2020), o bien libres de ADN (Metje-Sprink et al., 2019), y optimizando metodologías de transformación (Sandhya et al., 2020).

Debido a que el reconocimiento del sitio objetivo está mediado completamente por el *SgRNA*, *CRISPR/Cas9* se ha transformado en una de las herramientas más flexibles y fáciles de usar para la edición génica, eliminando la necesidad de diseñar nuevas proteínas para reconocer blancos diferentes (Rasheed et al., 2021). La edición de genes mediante *CRISPR/Cas9* depende de la disponibilidad de secuencias de buena calidad para luego hacer una selección cuidadosa de posibles *SgRNAs* para editar eficazmente genes blanco. Se han desarrollado múltiples herramientas bioinformáticas para escanear secuencias genómicas, elegir los mejores sitios blanco y predecir mutaciones no deseadas (Alamillo et al., 2023). Fuera del diseño de los *SgRNAs*, la única restricción para que el reconocimiento ocurra cuando se utiliza la proteína Cas9 es el motivo adyacente al protoespaciador (*Protospacer Adjacent Motif*, PAM), que es reconocido por la nucleasa y es esencial para que ésta introduzca un corte en el ADN. En el caso de la

proteína *SpCas9* la secuencia PAM se ubica adyacente al sitio de reconocimiento, en el extremo 3', y corresponde a la secuencia 5'-NGG-3' (*Gaj et al., 2016*).

En plantas, la estrategia más común para utilizar *CRISPR/Cas9* es a través de la transformación con construcciones génicas que expresen tanto los *SgRNAs* como la *Cas9*. La maquinaria de *CRISPR* puede estar dirigida hacia un único locus o múltiples loci, pudiendo generar organismos editados en varios loci, así como alelos del mismo loci, en forma simultánea. Asimismo, las construcciones génicas son relativamente pequeñas, debido a que la expresión de los *SgRNAs* en general está bajo el control de promotores para la ARN polimerasa III (promotores U3 o U6) los cuales son pequeños, como también lo son sus terminadores (tramo corto de timidinas; *Ma et al., 2016*). Una vez obtenidas las construcciones, el sistema de transformación/delivery del sistema es dependiente de qué planta se utilice. En el caso de soja, los dos métodos más utilizados para la transformación son la transformación de cotiledones mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (*Li et al., 2017*) y la biolística sobre embriones somáticos (*Finer, 2016*).

Posteriormente, al expresarse la proteína *Cas9* y el *SgRNA* se combinan para formar un complejo de ribonucleoproteína (RNP), que introduce un corte en la doble hebra del ADN (*double strand break, DSB*) en una secuencia homóloga al *SgRNA* que presenta una secuencia PAM en su extremo 3'. Una vez generado el daño en el ADN, la célula puede activar los mecanismos de reparación del ADN, los cuales pueden o no cometer errores, resultando en posibles mutaciones.

Existen dos vías principales de reparación del ADN en células somáticas de organismos eucariotas: la mediada por recombinación no homóloga o unión de extremos no homólogos (*Non Homologous End Joining, NHEJ*) y, en menor frecuencia, la mediada por recombinación homóloga (*Homologous Recombination, HR*) (*Figura 1*) (*Naik et al., 2022*). Los mecanismos de reparación ilegítima (*NHEJ*) dan lugar a inserciones o deleciones que pueden ocasionar cambios en el marco de lectura de proteínas o modificaciones en secuencias promotoras, pudiendo producir la eliminación de una proteína o cambios en la expresión génica. Por su parte, la reparación por *HR* puede ocurrir cuando está presente en la célula, un molde de ADN con homología con la región dañada (*Figura 1*); esto puede ser utilizado para integrar exactamente la modificación que uno desea en el lugar que uno desea (*Kim et al., 2014*).

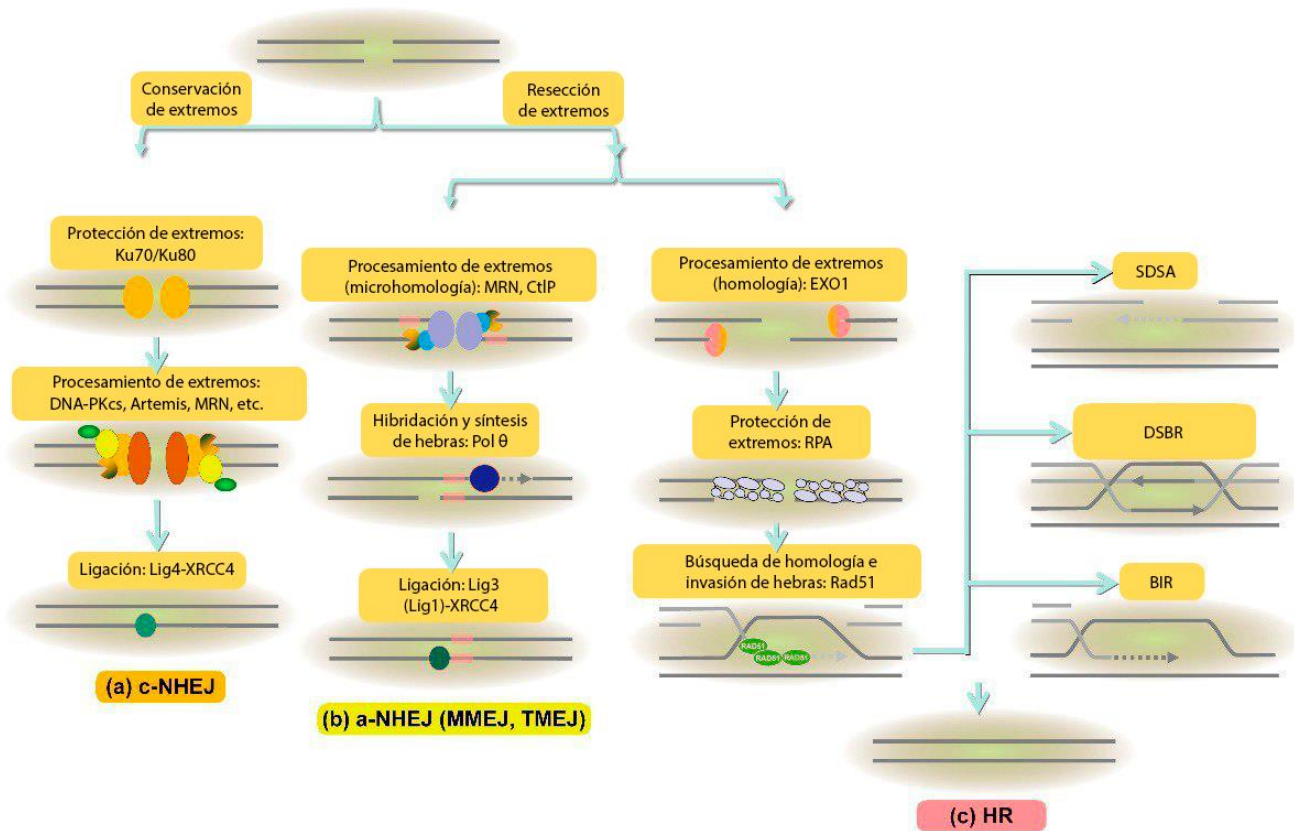


Figura 1. Vías principales de reparación de DSB en el ADN. (A) En la vía c-NHEJ, la unión de los DSB Ku70/80 protege los extremos del DSB de la resección. El reclutamiento de otros factores permite el procesamiento final de los extremos. El complejo Ligasa4-XRCC4 opera el paso final de ligación. (B) En las vías a-NHEJ (MMEJ o TMEJ), PARP1 sirve como plataforma en el extremo del DSB para reclutar otros factores, incluida la ADN polimerasa θ (Pol θ). Las uniones mediadas por microhomología entre los dos extremos del ADN son estabilizadas por Pol θ y funcionan como cebadores, mientras que el complejo XRCC1-Ligasa3 (Ligasa1) es responsable del paso final de ligación. (C) La HR se inicia mediante la resección final del ADN que involucra al complejo Exo1 y MRN (MRE11-RAD50-NBS1). Posteriormente, los overhangs de los ADN de simple hebra se recubren con RPA (Replication Protein A). Rad51 facilita la búsqueda de homología e invasión de las cadenas de ADN con complementariedad. En el paso final de HR, una de las tres subvías completan la reparación: SDSA (de Synthesis-dependent strand annealing), DSBR (de Double-strand break repair model) o BIR (de break-induced replication). En la vía DSBR, Rad52 y Rad59 estimulan el “arresto” del segundo extremo en un D-loop (displacement loop), generando dos uniones Holliday y estos se disuelven en productos mediante una helicasa RecQ. En la vía SDSA, la helicasa Mph1 suprime la vía DSBR, uno de los extremos 3'-protruyentes “invade” una doble hebra homóloga formando una estructura de tipo D-loop, promoviendo la hibridación del extremo 3' con secuencias complementarias en el otro extremo. Finalmente, en la vía BIR, el D-loop puede convertirse en una horquilla de replicación, restaurándose la integridad de un cromosoma copiando todo el brazo distal del cromosoma molde. BIR no se ha observado en plantas. Imagen adaptada de (Shen & Li, 2022) (doi: 10.3390/genes13020322)

Gene targeting

El *gene-targeting* (GT) es una técnica utilizada con el fin de introducir fragmentos de ADN de interés en sitios específicos del genoma. En general, GT se basa en HR para lograr la inserción sitio-dirigida de una secuencia en el genoma de una célula (Chen et al., 2022). La HR es un mecanismo endógeno que

permite reparar el ADN dañado o realizar entrecruzamientos durante la meiosis (Huang & Puchta, 2019). Sin embargo, la actividad de *HR* es baja en la mayoría de tipos celulares eucariotas, y debido a esto, las técnicas de *GT* presentan dificultad en su aplicación. Las técnicas de *GT* pueden utilizarse para producir *KOs* de genes específicos, generar inserciones y/o realizar reemplazos de genes o alelos (*KI*), conteniendo mutaciones puntuales definidas (Voytas, 2013). Esto es en contraposición a las mutaciones generadas por *NHEJ*, las cuales son generalmente impredecibles (Huang & Puchta, 2019). El *GT* requiere de la introducción a la célula de un molde de ADN que incluya las modificaciones genéticas buscadas y que presente homología con el locus nativo (Voytas, 2013). En la *Tabla 1* se resumen algunos ejemplos de *GT* en plantas.

Tabla 1. Ejemplos de *Gene Targeting* en plantas.

Gen editado	Organismo	Método de introducción del sistema CRISPR/Cas9	Molde reparador	Explante transformado	¿Se logró <i>HR</i> ?	Referencia
<i>ALS</i>	Tabaco (<i>N. benthamiana</i>)	Vector vía <i>Agrobacterium</i>	Geminivirus vía <i>Agrobacterium</i> (transformación simultánea)	Infiltración de hojas	NO (<i>NHEJ</i>)	Baltes et al., 2014
<i>ALS2</i>	Maíz (<i>Z. mais</i>)	Vector vía biolística	dsADN o ssADN oligo vía biolística (transformación simultánea)	Embriones inmaduros	SI	Svitashev et al., 2015
<i>ANT1</i>	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>)	Vector vía <i>Agrobacterium</i>	Geminivirus vía <i>Agrobacterium</i> (transformación simultánea)	Cotiledones	SI	Čermák et al., 2015
<i>DD20/DD43</i> / <i>ALS1</i>	Soja (<i>G. max</i>)	Vector vía biolística	dsADN vía biolística (transformación simultánea)	Embriones somáticos	NO (<i>ALS1</i> ; <i>NHEJ</i>) SI (<i>DD20/DD43</i>)	Li et al., 2015
<i>ALS1</i>	Papa (<i>S. tuberosum</i> L.)	Vector vía <i>Agrobacterium</i>	Geminivirus vía <i>Agrobacterium</i> (transformación simultánea)	Explantes	SI	Butler et al., 2016
<i>EPSPS</i>	Lino (<i>L. usitatissimum</i>)	Vector vía PEG	ssADN oligo vía biolística (transformación simultánea)	Protoplastos	SI	Sauer et al., 2016
<i>ALS</i>	Arroz (<i>O. sativa</i>)	Vector vía <i>Agrobacterium</i>	Vector vía <i>Agrobacterium</i> (transformación secuencial)	Callos embriogénicos	SI	Endo et al., 2016
<i>EPSPS</i>	Arroz (<i>O. sativa</i>)	Vector vía biolística	Plásmido circular vía biolística (transformación simultánea)	Callos embriogénicos	NO (<i>NHEJ</i>)	Li et al., 2016
<i>ALS</i>	Arroz (<i>O. sativa</i>)	Vector vía biolística	Plásmido circular vía biolística (transformación simultánea)	Callos embriogénicos	SI	Sun et al., 2016
<i>CAO1</i>	Arroz (<i>O. sativa</i>)	Vector vía biolística	Plásmido circular vía biolística (transformación simultánea)	Callos embriogénicos	SI	Begemann et al., 2017

<i>GFP</i> (promotor)	Trigo (<i>T. aestivum</i>)	Vector vía biolística	Geminivirus vía biolística (transformación simultánea)	Escutelo	SI	<i>Gil-Humanes et al., 2017</i>
<i>GFP</i> (promotor)	Trigo (<i>T. aestivum</i>)	Vector vía PEG	Geminivirus vía PEG (transformación simultánea)	Protoplastos	SI	<i>Gil-Humanes et al., 2017</i>
<i>ACT1/GST</i>	Arroz (<i>O. sativa</i>)	Vector vía <i>Agrobacterium</i>	Geminivirus vía <i>Agrobacterium</i> (transformación simultánea)	Callos embriogénicos	SI	<i>Wang et al., 2018</i>
<i>At1g53430</i>	<i>A. thaliana</i>	Vector vía <i>Agrobacterium</i>	Mismo vector	Flores	NO (NHEJ)	<i>Shan et al., 2018</i>
<i>ARGOS8</i> (promotor)	Maíz (<i>Z. mais</i>)	Vector vía biolística	Plásmido circular (transformación simultánea)	Embriones inmaduros	SI	<i>Shi et al., 2017</i>
<i>EPSPS</i>	Casava (<i>M. esculenta</i>)	Vector vía <i>Agrobacterium</i>	Geminivirus vía <i>Agrobacterium</i> (simultánea)	Callos embriogénicos	SI	<i>Hummel et al., 2018</i>
<i>CRTISO</i>	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>)	Vector vía <i>Agrobacterium</i>	Geminivirus vía <i>Agrobacterium</i> (transformación simultánea)	Cotiledones	SI	<i>Dahan-Meir et al., 2018</i>
<i>PSY1</i>	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>)	Vector vía <i>Agrobacterium</i>	Geminivirus vía <i>Agrobacterium</i> (transformación simultánea)	Cotiledones	SI	<i>Dahan-Meir et al., 2018</i>
<i>GR2</i>	Arroz (<i>O. sativa</i>)	Vector vía biolística	Plásmido circular vía biolística (transformación simultánea)	Callos embriogénicos	NO (NHEJ)	<i>Dong et al., 2020</i>
<i>ANT1</i>	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>)	Vector vía <i>Agrobacterium</i>	Geminivirus vía <i>Agrobacterium</i> (transformación simultánea)	Cotiledones	SI	<i>Vu et al., 2020</i>
<i>ALS</i>	Caña de azúcar (<i>Saccharum spp. Hybrid</i>)	Vector vía biolística	dsADN vía biolística (transformación simultánea)	Callos embriogénicos	SI	<i>Oz et al., 2021</i>
<i>EPSPS</i>	Arroz (<i>O. sativa</i>)	Vector vía biolística	Plásmido circular vía biolística (transformación simultánea)	Callos embriogénicos	SI	<i>Sony et al., 2023</i>

Notas: ANT: Anthocyanin mutant. ALS: Acetolactate synthase. ACT: Actin. GST: Glutathion-S-transferase. EPSPS: 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. GFP: green fluorescent protein. ARGOS8: negative regulator of ethylene responses. At1g53430: Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase. DD20/DD43: two genomic sites in chromosome 4 of *Glycine max*. GR2: Golden Rice 2 cassette. CRTISO: Carotenoid isomerase. PSY1: Phytoene synthase 1.

Base editing y prime editing

Más recientemente, se han desarrollado nuevos sistemas de edición para poder sortear algunas limitaciones de los sistemas anteriores como la baja eficiencia, el gran número de mutaciones y deleciones no deseadas y las restricciones relacionadas al ciclo celular. Dos de los sistemas que se han desarrollado son mediados por el sistema *CRISPR/Cas9*: el *base editing* (BE) y el *prime editing* (PE) (*Kantor et al., 2020*). Estos sistemas tienen en común que para su acción no requieren de la generación de *DSBs* (*Kantor et al., 2020*) y recaen en el uso de una Cas9 con uno o sus dos dominios endonucleasa, RUVc y HNH, mutados (nCas9 o dCas9; *Kantor et al., 2020*), asociado a proteínas con capacidad para modificar el ADN.

En el caso del *BE*, se utiliza la dCas9 asociada a una desaminasa y existen tres grupos principales: los editores de citosina (*CBE*) para transiciones de C:G a T:A, editores de base de C a G (*CGBE*) para transiciones de G:C a C:G y editores de base de adenina (*ABE*) para transiciones de A:T a G:C (*Bhuyan et al., 2023*). El *BE*, es una técnica atractiva por su capacidad de inducir mutaciones precisas sobre las bases específicas del genoma. A su vez, no implica realizar inserciones ni deleciones, por lo que el contenido de ADN del organismo se mantiene inalterado. Además, debido a que los cambios de bases son mínimos, los efectos no deseados en el fenotipo de las plantas son limitados. Finalmente, al no incorporar ADN foráneo, no es necesario tratar a los productos como OGMs, siendo una gran ventaja para la regulación (*Dhakate et al., 2022*).

Por su parte, el *PE* puede emplearse tanto para hacer mutaciones de transición y transversión (reemplazo de pirimidina por una purina o viceversa), como también para generar pequeñas inserciones o deleciones (*Kantor et al., 2020*). En este caso, se utiliza una nCas9, con capacidad para hacer un corte en solo una hebra del ADN, asociada a una transcriptasa reversa (*RT*) y a un ARN llamado *prime-editing-RNA* (*pegRNA*; *Dhakate et al., 2022*). El *pegRNA* se diferencia de los *SgRNAs* en que además de contener la secuencia que guía a la proteína Cas9 hacia su sitio blanco, posee una secuencia adicional que contiene los cambios de secuencia deseados en el 3', sumado a una región denominada *PBS* (por *primer binding sequence*) (*Kantor et al., 2020*). La región *PBS* del *pegRNA* se hibrida a la segunda cadena de ADN y la enzima *RT* retrotranscribe la secuencia a ser editada copiando la información directamente del *pegRNA* en el sitio blanco. Finalmente, los *over-hangs* de los extremos 5' y 3' restantes de la monohebra son integrados en el ADN genómico a través de mecanismos de reparación endógenos (*Dhakate et al., 2022*). Este proceso deja una hebra editada y una hebra no editada. En el sistema de *PE* más nuevo, *PE3* y *PE3b*, la cadena sin editar se puede corregir para que coincida con la cadena recién editada utilizando un ARN guía adicional. En este caso, la hebra sin editar se corta con una nickasa Cas9 y la hebra recién editada se utiliza como plantilla para reparar el corte completando así la edición (*Abdullah et al., 2020*).

Los *CGBEs* (descubiertos en 2021) y los *PEs* (principalmente utilizados en bacterias y mamíferos), son tecnologías que están siendo evaluadas en plantas y aún requieren cierto desarrollo ya que los niveles de eficiencia en estos organismos son notoriamente más bajos que *CBEs* y *ABEs* (*Bhuyan et al., 2023*). Sin embargo, existen algunos ejemplos exitosos de la utilización de *BE* y *PE* para generar cultivos con características novedosas (*Abdullah et al., 2020*). Por mencionar algunos ejemplos, el *BE* ha sido utilizado en plantas de tomate para generar plantas con sustituciones en el gen *DELLA* (Solyc11g011260) en homocigosis y sin marcadores de selección (*Shimatani et al., 2017*). Otro ejemplo es la generación de

frutillas con mayor contenido de azúcar modificando el ORF conservado del factor de transcripción *FvebZIPs1.1* de frutilla (Xing et al., 2020).

Edición génica en el cultivo de soja

La soja (*Glycine max* [L.] Merr) es una de las leguminosas de mayor importancia económica, ya que proporciona más de una cuarta parte de la proteína mundial para el consumo humano y animal y está incluida dentro de los 16 cultivos principales en el mundo: cebada, yuca, maní, maíz, papa, palma aceitera, colza, arroz, centeno, sorgo, soja, remolacha, caña de azúcar, girasol y trigo (Dong et al., 2021; Pagano & Miransari, 2016). La producción global de soja en 2022/2023 fue de 370 millones de toneladas, mientras que para 2023/2024 se estima en 399 millones de toneladas (USDA, 2024). La producción de soja en regiones de latitudes bajas (Brasil, Argentina e India) representó el 53 % de la producción mundial total según lo reportado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos en el año 2020 (Dong et al., 2021).

La soja constituye una de las mayores fuentes de aceite vegetal y ración animal del mundo. Por otro lado, tiene el mayor contenido de proteínas (40–42 %) de todos los demás cultivos alimentarios y ocupa el segundo lugar después del maní con respecto al contenido de aceite (18-22 %). Además, la soja se utiliza en la acuicultura y en el rubro de los biocombustibles, así como fuente de proteína en la dieta humana (Pagano & Miransari, 2016).

Como muchos de los cultivos más importantes del mundo, la soja es una especie autógama, siendo ésta una de las razones por las que la diversidad genética se ha ido reduciendo a lo largo de la historia del cultivo. A su vez, eventos evolutivos como la domesticación, los eventos fundacionales y la selección, pueden afectar el nivel de variación de secuencias en un cultivar. El proceso de domesticación ocurre cuando los humanos ejercen una selección artificial sobre una especie silvestre y esta selección, tanto positiva como negativa, a lo largo de cientos de generaciones da como resultado la creación de nuevos cultivares (Hyten et al., 2006). El cultivar de soja fue domesticado a partir de su progenitor silvestre (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) en las regiones templadas de China hace aproximadamente 5000 años (Dong et al., 2021). Se ha reportado que aproximadamente la mitad de la diversidad genética y el 81 % de los alelos raros se perdieron durante el proceso de domesticación desde *G. soja* hasta las variedades actuales. Además, se estima que sólo 19 variedades contribuyeron con hasta el 85 % de los genes a los pools genéticos de América del Norte (Sedivy et al., 2017), que a su vez conforman los recursos genéticos a partir de los cuales se han alimentado los programas de mejoramiento genético de soja del resto del

mundo. Debido a esto, puede resultar difícil encontrar recursos genéticos útiles para mejorar algunas características de interés, a través de técnicas de mejoramiento convencional (Hyten et al., 2006).

En el caso particular de Uruguay, la soja es el principal cultivo desde hace al menos 20 años (DIEA, 2024). En sus mejores años, la soja ha tenido una posición clave en el PBI de nuestro país, encabezándolo junto con el ganado en pie y la celulosa (Uruguay XXI, 2024). Si bien la soja es un cultivo de secano, lo que quiere decir que el agua para su crecimiento proviene exclusivamente de las precipitaciones, se trata de una especie muy sensible a la sequía (Plan Agropecuario, 2024). En la zafra 2022/2023, la cual estuvo expuesta a una de las peores sequías de los últimos 40 años, se cultivaron 1.009.899 hectáreas (MGAP - Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de Uruguay, 2023). El rendimiento fue de 641 kilogramos por hectárea sembrada, el registro más bajo desde 1998. La producción de soja se estimó en 647.830 toneladas, la cuarta parte de lo cosechado en la zafra 2021/2022 (MGAP - Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de Uruguay, 2023).

Debido a lo mencionado anteriormente, es de suma importancia seguir invirtiendo en los programas de mejoramiento de soja, especialmente buscando nuevas formas de generar diversidad y tolerancia a estreses bióticos y abióticos. Teniendo en cuenta las tendencias en el marco regulatorio, el uso de metodologías de edición génica representa una herramienta prometedora para nutrir estos programas.

Antecedentes del proyecto

Este trabajo se planteó como una continuación de mis estudios de grado y su objetivo principal consistió en desarrollar metodologías de reemplazo alélico en soja utilizando el sistema *CRISPR/Cas9*. La estrategia experimental consistió en utilizar como blanco de reemplazo alélico un gen codificante para la 5-enolpiruvato-shikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa (EPSPS), con el propósito de conferir resistencia al herbicida glifosato (Figura 2). Este herbicida es un derivado de glicina modificado con N-fosfonometilo que es capaz de formar un complejo inactivo estable con la enzima EPSPS (Sammons & Gaines, 2014). La EPSPS participa en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, la tirosina y el triptófano, a través de la vía del Shikimato en bacterias, hongos y plantas (Pollegioni et al., 2011). En la vía del shikimato, ubicada a nivel cloroplástico, la EPSPS convierte el fosfoenolpiruvato (PEP) y shikimato-3-fosfato (S3P) en 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) y fosfato inorgánico. El herbicida actúa como análogo de estado de transición competitivo con el fosfoenolpiruvato (PEP), al formar un complejo ternario estable no covalente con el complejo enzima-S3P-glifosato. El glifosato causa la muerte de las plantas al privarlas de aminoácidos aromáticos (Firdous et al., 2018).

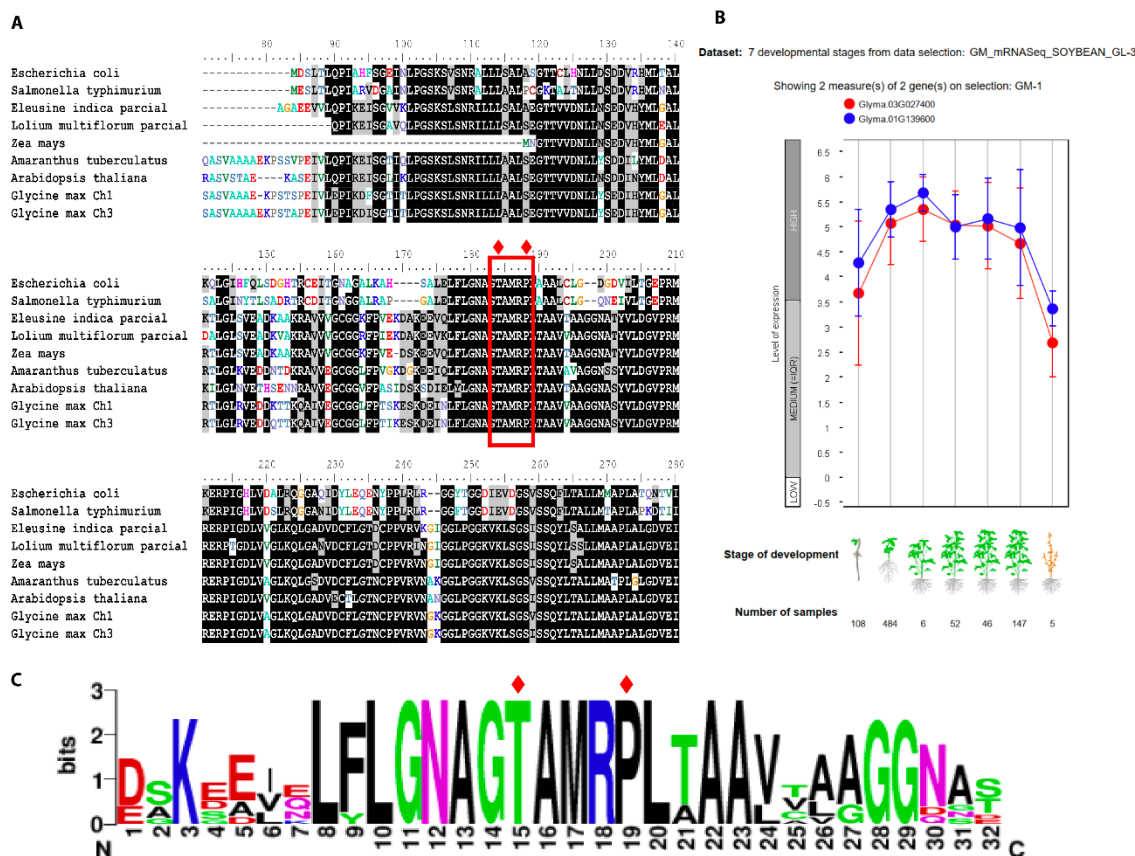


Figura 2. (A) Alineamiento parcial de las EPSPSs de soja y sus homólogos en diferentes especies (*G. max* Ch1 (Glyma.01G139600.1), *G. max* Ch3 (Glyma.03G027400.1), *A. thaliana* (AT1G48860.1), *Z. mays* (Zm00008a033811_T01), *E. indica* parcial (AAN63155.1), *L. multiflorum* parcial (AAZ79230.2), *A. tuberculatus* (ACV67278.1), *S. typhimurium* (AAA27028.1) y *E. coli* (NEY26641.1). En rojo se muestra la localización del sitio de unión al fosfoenolpiruvato y donde se hallan las mutaciones TIPS y TIPA. La conservación aminoacídica se encuentra sombreada con un threshold de 65. Con asteriscos se muestran los sitios de mutaciones T102 y P106 (numeración acorde a la EPSPS de *E. coli*). **(B)** Valores de expresión para los genes *EPSPS1* (Glyma.01G139600.1, en azul) y *EPSPS3* (Glyma.03G027400.1, en rojo) en diferentes estadios de desarrollo. Los valores fueron obtenidos a partir de datos de ARN-seq utilizando el recurso web Geneinvestigator (<https://geneinvestigator.com/gv/index.jsp>). Se observan patrones similares de expresión entre los genes en diferentes estadios de desarrollo. **(C)** Logo de la estructura primaria del sitio de unión al PEP y región flanqueante generado con el recurso weblogo (<https://weblogo.berkeley.edu/>). El logo muestra el elevado grado de conservación a nivel del sitio de unión al PEP, donde la identidad de secuencia alcanza el 96 %. En asteriscos se indican la Thr102 y la Pro106. Los números de acceso utilizados fueron NEY26641.1, AAA27028.1, AAN63155.1, AAZ79230.2, Zm00008a033811_T01, ACV67278.1, AT1G48860.1, Glyma.01G139600.1 y Glyma.03G027400.1.

El presente trabajo parte de la hipótesis que al sustituir la EPSPS silvestre (EPSPS_{WT}) por una versión del gen conteniendo mutaciones (dominantes) que confieren insensibilidad al glifosato, las plantas obtenidas serán resistentes a este herbicida. Esta estrategia simplifica la detección de las plantas editadas ya que confiere un marcador fenotípico fácil de detectar. Tiene la ventaja adicional de que los mecanismos

de resistencia al glifosato están bien caracterizados (Sammons & Gaines, 2014) lo que sustenta la estrategia planteada.

Existen diversos mecanismos que ocurren naturalmente para conferir resistencia al glifosato, entre ellos, la selección de cambios aminoacídicos en la enzima blanco que afectan la interacción con el herbicida (*target-site resistance*), la introducción de modificaciones químicas sobre el herbicida, por ejemplo la conjugación a otras moléculas o la degradación, y finalmente, mecanismos de exclusión física, a través de reforzamiento de la cutícula, o exclusión fisiológica, fundamentalmente secuestro en la vacuola mediado por transportadores (Sammons & Gaines, 2014). En este trabajo nos interesa en particular usar los mecanismos de *target-site resistance*.

Las mutaciones más frecuentes encontradas naturalmente involucran a la Pro106 que en general es sustituida por los aminoácidos Ala, Leu, Ser o Thr. Estas mutaciones se han encontrado naturalmente en las especies *Lolium multiflorum*, *Eleusine indica* y *Amaranthus tuberculatus* y son de carácter dominante (Sammons & Gaines, 2014). La Pro106 no está directamente involucrada en interacciones moleculares con el glifosato o el sustrato PEP, pero el cambio aminoacídico provoca un cambio estructural en el sitio activo y desplaza otros aminoácidos hacia el inhibidor, reduciendo el espacio disponible (Sammons & Gaines, 2014). Asimismo, la mutación Pro106-Ser produce un aumento en la constante de inhibición (Sammons & Gaines, 2014). La generación de mutaciones simultáneas confiere niveles de resistencia mayores y a la vez permiten que la proteína mantenga una afinidad suficiente por el sustrato PEP, aventajando la mutación simple Pro106-Ser. Entre ellas se encuentra la doble mutación Thr102Ile + Pro106Ser (TIPS) en el sitio de unión al PEP; esta variante es utilizada en cultivos transgénicos de maíz (*Roundup Ready*) y se ha reportado su aparición naturalmente en poblaciones de *E. indica*. De igual forma, se encontró que la mutación Thr102Ile + Pro106-Ala (TIPA) confiere resistencia al herbicida (Healy-Fried et al., 2007) (Figura 2).

Como antecedente, durante mi trabajo de grado se generaron herramientas que sirvieron de punto de partida para continuar con este trabajo. Se generaron versiones mutadas de la EPSPS1 (Glyma.01G139600) de soja (EPSPS_{TIPS} y EPSPS_{TIPA}) y fueron transformadas en *A. thaliana*. A su vez, se avanzó en la evaluación de herramientas para modificar el genoma de soja. Específicamente, se diseñaron y evaluaron *SgRNAs* para el reconocimiento de la secuencia de EPSPS1. También se generaron los moldes de reemplazo, que consisten en regiones genómicas homólogas a la EPSPS conteniendo las mutaciones TIPS o TIPA, los cuales fueron empleados en el trabajo actual para generar los vectores de reemplazo finales.

Hipótesis

La EPSPS es una enzima muy conservada que participa en la síntesis de aminoácidos aromáticos, siendo el blanco de la acción del herbicida glifosato. Existen variantes mutantes de genes *EPSPS* que están bien caracterizadas en diferentes especies de plantas (*Lolium multiflorum*, *Eleusine indica* y *Amaranthus tuberculatus*) y que son insensibles a glifosato. El trabajo parte de la premisa de que las mutaciones TIPS (Thr102-Ile + Pro106-Ser) o TIPA (Thr102Ile + Pro106-Ala) (generadas previamente sobre el gen *EPSPS1* de soja), producen una variante de la enzima EPSPS resistente al glifosato. Estos antecedentes permitieron el diseño y generación de una variante mutada del gen *EPSPS1* de soja, conteniendo las mutaciones TIPS y TIPA. Este gen será evaluado en cuanto a su resistencia al herbicida glifosato y utilizado como molde de reparación para editar el gen *EPSPS1* de soja mediante recombinación homóloga. El uso de este gen como blanco de edición génica permitirá contar con un fenotipo fácilmente detectable para identificar posibles eventos editados. Este sistema facilitará la optimización de metodologías de reemplazo alélico en soja, actualmente no disponibles.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo es optimizar metodologías de edición génica basadas en la recombinación homóloga en soja (*Glycine max*).

Los objetivos específicos del proyecto son:

1. Determinar si las mutaciones TIPS (Thr102-Ile + Pro106-Ser) o TIPA (Thr102Ile + Pro106-Ala) en la *EPSPS1* de soja, generadas por mutagénesis *in vitro*, confieren insensibilidad al herbicida glifosato en un sistema heterólogo (*Arabidopsis thaliana*).
2. Determinar la factibilidad y eficiencia de la obtención de eventos de reemplazo alélico mediados por *CRISPR/Cas9*, del gen *EPSPS1* en ensayos *in vivo* transitorios utilizando la técnica de raíces transformadas (*hairy roots*).

Materiales y métodos

1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

1.1. *Arabidopsis thaliana*

Se utilizó el genotipo de *Arabidopsis thaliana* accesión Columbia Col-0. Las plantas fueron germinadas *in vitro* y luego transferidas a cámara de crecimiento. Para el crecimiento *in vitro*, se esterilizaron superficialmente las semillas sumergiéndolas en EtOH 70 % por un máximo de 5 minutos, seguido de una solución de hipoclorito de sodio 25 g/L y 0.1 % Tritón X-100 durante 15 minutos en rotación. Pasado este tiempo, se realizaron al menos 4 lavados con H₂O-miliQ estéril. Las semillas se sembraron sobre placas de medio MS (*Murashige & Skoog, 1962*) con la mitad de concentración de sales MS (½ MS: 2.1 g/L medio MS, pH 5.7, 0.5 % agar) y se dejaron a 4 °C por 3-5 días para su estratificación. Posteriormente, las placas se transfirieron a cámara de crecimiento *in vitro* bajo lámparas de LED con una intensidad lumínica de 100 µmol fotones m⁻² seg⁻¹, un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad a 22 °C entre una y dos semanas. Las plantas germinadas fueron trasplantadas a turba y se cultivaron en cámara de crecimiento con 150 µmol fotones m⁻² seg⁻¹ de intensidad lumínica y un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad a 25 °C. Como solución de riego se utilizó agua destilada, suplementando con medio ½ MS una vez a la semana.

1.2. *Nicotiana benthamiana*

Las plantas de *N. benthamiana* se cultivaron en cámara de crecimiento con 100 µmol fotones m⁻² seg⁻¹ de intensidad lumínica y un fotoperiodo 16 horas luz/8 horas oscuridad, a 25 °C. Como solución de riego se utilizó agua destilada, suplementando con medio ½ MS una vez a la semana.

2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

2.1 *Escherichia coli*

Para las transformaciones se utilizaron células competentes de la cepa Top10 de *Escherichia coli* (*E. coli*) y la cepa DB3.1 de *E. coli*. Ambas cepas fueron incubadas en medio Luria-Bertani (10 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl, 5 g/L de extracto de levadura) (*Sezonov et al., 2007*) líquido o sólido (LB 1.5 % agar) suplementado con el antibiótico correspondiente, a 37 °C, toda la noche (ON: *over-night*) y con agitación constante (180 rpm) en el caso de cultivos líquidos.

2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación de *N. benthamiana* se utilizó la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) resistente a rifampicina (Rf, 100 µg/mL) y a carbenicilina (Cb, 100 µg/mL). Las bacterias fueron incubadas en medio YEP (10 g/L de peptona, 5 g/L de NaCl, 10 g/L de extracto de levadura) (*Leth & McDonald, 2017*) líquido o sólido (LB 1.5 % agar) suplementado con el antibiótico correspondiente, a 28 °C, durante 48 horas con agitación constante (200 rpm) en el caso de cultivos líquidos.

2.3 *Agrobacterium rhizogenes*

Para las transformaciones de soja se utilizaron células competentes de la cepa K599 de *Agrobacterium rhizogenes* (*A. rhizogenes*). La cepa fue incubada en medio YM (10 g/L de manitol, 0.5 g/L de K₂HPO₄·3H₂O, 0.4 g/L de extracto de levadura, 0.2 g/L de MgSO₄·7H₂O, 0.1 g/L de NaCl, pH 7) (*Lin et al., 1994*) líquido o sólido (1.5 % agar) suplementado con el antibiótico correspondiente para cada transformación, a 28 °C, durante 48 horas con agitación constante (200 rpm) en el caso de cultivos líquidos.

3. Extracción de ADN genómico de líneas transgénicas de *A. thaliana* y hairy-roots de soja

En un tubo de tipo eppendorf, se colocaron 100 mg de material vegetal de *A. thaliana* transgénicas (Generación T3) o *hairy-roots* de soja junto con 3 partículas de zirconio de 2 mm. Luego de sumergir las muestras en nitrógeno líquido (N₂), se procedió rápidamente a moler el material vegetal utilizando un homogeneizador de tejidos de tipo beadbeater (Biospec) durante 1 minuto. A cada muestra se le agregaron 700 µL del buffer 2X CTAB (2 % w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 % β-mercaptoetanol). Se incubó durante 30 minutos a 65 °C mezclando suavemente cada 10 minutos. Se agregaron 600 µL de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. Se centrifugó por 10 minutos a 8000 x g a temperatura ambiente (*RT, room temperature*). Se tomó la fase superior, acuosa, y se transfirió a un tubo de microcentrifuga nuevo. Se agregaron 5 µL de RNasa (20 mg/mL) y se incubó 10 minutos a *RT*. Se agregaron nuevamente 600 µL de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó por 10 minutos a 8000 x g a *RT*. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo, al cual se le agregó un volumen igual de isopropanol. Se dejó a -20 °C entre 1 hora y 30 minutos a ON. Se centrifugó a 16000 x g durante 20 minutos. Se lavó el pellet con EtOH 70 %, se dejó secar y se resuspendió en H₂O-miliQ.

4. Análisis de presencia del transgén en líneas de *A. thaliana* mediante PCR

Se analizó la presencia del transgén en plantas de *A. thaliana* transformadas (*Punto 10*) con una construcción que permite la expresión de la EPSPS1 de soja bajo el control del promotor AtUBI y contiene un *cassette* de resistencia a glufosinato de amonio. Plantas transgénicas de *A. thaliana* de la generación T3 fueron germinadas en placas de medio ½ MS con agregado de 20 mM glufosinato de amonio, transferidas a turba y crecidas en las condiciones descritas en el *Punto 1* hasta que tuvieran aproximadamente tres semanas de edad. Se realizó extracción de ADN como se describe en el *Punto 3*.

La presencia del transgén *EPSPS1* (Glyma.01G139600) fue analizada mediante PCR utilizando la polimerasa DreamTaq (Thermo, EP0701) empleando los *primers forward* 5'-TTTGTGACGGGGGCTCAAATCTCGCATC-3' y *reverse*: 5'-TGCGGCCGCTCAATTTCCACATCACCAAGAGC-3' y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El programa utilizado para la PCR fue: desnaturalización inicial: 98 °C, 2 minutos; 30 ciclos de: desnaturalización: 98 °C, 30 segundos; hibridación: 61 °C, 30 segundos; extensión: 72 °C, 45 segundos; extensión final: 72 °C, 5 minutos. Finalmente se verificó la PCR por electroforesis en gel de agarosa 1 %.

5. Extracción de ARN de *A. thaliana* y síntesis de ADNc para análisis de expresión por RT-PCR

Para la extracción de ARN total, se utilizó un protocolo casero de extracción con una combinación de buffer NTES y fenol:cloroformo. Se pulverizó 100 mg de material vegetal (hojas de *A. thaliana*) con N₂ líquido y se añadieron 600 µL de buffer NTES (0.1 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 % SDS) y 300 µL de fenol para ARN (pH 4.5). Se agregaron 300 µL de cloroformo. Se centrifugó la muestra a 3500 x g por 20 minutos a temperatura ambiente para separar las fases. Se transfirió la fase superior, acuosa, a un nuevo tubo y se añadieron 600 µL de acetato de sodio (NaAc) 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de EtOH puro. Se incubó el tubo a -20 °C por tres horas y se centrifugó a 5000 x g por 15 minutos a RT. Se agregaron 750 µL de LiCl 4 M y se incubó en hielo ON. Se centrifugó a 11000 x g por 15 minutos y se secó el pellet. Se resuspendió el pellet en 300 µL de H₂O-miliQ, 30 µL de NaAc 3 M pH 5.2 y 800 µL de EtOH puro. Se centrifugó a 11000 x g por 15 minutos y se secó el pellet. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con EtOH 75 %, se secó y se resuspendió en H₂O-miliQ. El ARN se almacenó a -80 °C hasta su uso. El H₂O-miliQ, solución de NaCl 5M y NaAc 3M fueron tratadas previamente con dietilpirocarbonato (DEPC) a una concentración final de 0.1 % v/v ON y autoclavadas durante 40 minutos antes de su uso.

La calidad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. Se preparó un gel de agarosa 1 % w/v de acuerdo al protocolo descrito en *Pandey & Saluja, 2017*.

La síntesis del ADNc se llevó a cabo utilizando el kit *RevertAid Reverse Transcriptase* (Thermo, Cat. K1691) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

6. Análisis de expresión de líneas transgénicas de *A. thaliana* mediante RT-PCR

Plantas transgénicas de *A. thaliana* de la generación T3 fueron germinadas en placas de medio ½ MS con agregado de 20 mM glufosinato de amonio, transferidas a turba y crecidas en las condiciones descritas en el *Punto 1* hasta que tuvieran aproximadamente tres semanas. Se realizó la extracción de ARN y la síntesis de ADNc de acuerdo a lo establecido en el *Punto 5*. La secuencia codificante del gen *EPSPS1* (Glyma.01G139600.1) fue amplificada a partir del ADNc obtenido de las plantas transgénicas de *A. thaliana* utilizando la polimerasa DreamTaq (Thermo, EP0701). La reacción se preparó de acuerdo a las especificaciones sugeridas por el fabricante empleando los *primers forward* 5'-TTTGTCGACGGGGGCCTCAAATCTCGCATC-3' y *reverse* 5'-TGCGGCCGCTCAATTTCCACATCACCAAGAGC-3'. El programa de RT-PCR fue el establecido en el *Punto 4*. La cantidad de transcrito se normalizó en relación al gen de actina (AT3G18780), el cual se expresa de forma constitutiva (*Zhao et al., 2011*), empleando los *primers forward* 5'-GTATCGCTGACCGTATGAG-3' y *reverse* 5'-CTGCTGGAATGTGCTGAG-3'. El programa utilizado para la RT-PCR de actina fue: desnaturalización inicial: 98 °C, 2 minutos; 30 ciclos de: desnaturalización: 98 °C, 30 segundos; hibridación: 49 °C, 30 segundos; extensión: 72 °C, 45 segundos; extensión final: 72 °C, 5 minutos. Finalmente se verificó la RT-PCR por electroforesis en gel de agarosa 1 %.

7. Ensayo de sensibilidad de líneas transgénicas de *A. thaliana* al herbicida glifosato

Para los ensayos en placa, plantas transgénicas de *A. thaliana* de la generación T3 fueron germinadas en placas de medio ½ MS con agregado de 20 mM glufosinato de amonio por una semana en las condiciones descritas en el *Punto 1*. Las plantas fueron transferidas a placas de medio ½ MS con agregado de 15 mM de glifosato y crecidas en las condiciones descritas en el *Punto 1* por una semana. Para los ensayos en tierra, plantas transgénicas de *A. thaliana* de la generación T3 fueron germinadas en placas de medio ½ MS con agregado de 20 mM glufosinato de amonio, transferidas a turba y crecidas en las condiciones descritas en el *Punto 1*, hasta que comenzaran a desarrollar botones florales. Una vez llegado a este estadio, se pulverizaron las plantas con distintas concentraciones de glifosato (100 mM, 250 mM, 500 mM) y como control se utilizó H₂O destilada. Las condiciones se analizaron por triplicado.

8. Ensayo de rendimiento de líneas transgénicas de *A. thaliana* frente al herbicida glifosato

Plantas transgénicas de *A. thaliana* de la generación T3 fueron germinadas en placas de medio ½ MS con agregado de 20 mM glufosinato de amonio, transferidas a turba y crecidas en las condiciones descritas en el *Punto 1*, hasta que comenzaran a desarrollar botones florales. En ese momento, las plantas fueron pulverizadas con glifosato 80 mM. Las plantas control fueron pulverizadas con H₂O destilada. Las semillas de plantas individuales fueron colectadas y pesadas para evaluar el rendimiento de cada planta.

9. Análisis estadístico de ensayo de rendimiento de líneas transgénicas de *A. thaliana* frente al herbicida glifosato

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de un análisis de Tukey a posteriori para analizar las diferencias significativas entre los grupos, utilizando el paquete estadístico de RStudio.

10. Diseño y evaluación *in vitro* de *SgRNAs*

Se generaron tres *SgRNAs* dirigidos hacia el exón 2 del gen *EPSPS1* (*SgRNA-1*, *SgRNA-4* y *SgRNA-11*). Las secuencias blanco fueron seleccionadas utilizando el recurso web ccTop (*Stemmer et al., 2015*). Los oligos *Fw* y *Rv* necesarios para la producción de los adaptadores (*target adaptors*, TA) fueron adquiridos de la empresa Macrogen. A las secuencias predichas por el programa ccTop se les agregaron secuencias protruyentes (*overhangs*), compatibles con los generados en el vector tras el corte con *BbsI*. Esto es: *Fw*: 5'-GAGAGG + protoespaciador-3' y *Rv*: 5'- AAAC + protoespaciador + CC-3'. Los adaptadores fueron clonados en el vector pEn-Chimera T7 Expression (*Fauser et al., 2014*) mediante restricción, siendo la enzima *BbsI* la empleada para este fin.

La transcripción *in vitro* (*IVT: in vitro transcription*) de los *SgRNAs* se realizó utilizando el kit TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Cat. K0441) siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Para los ensayos de evaluación *in vitro* de los *SgRNAs*, se purificó la proteína Cas9-GFP-MBP de acuerdo a lo establecido en (*Fleitas et al., 2022*). Se prepararon reacciones para ensayos de corte de Cas9 utilizando como blanco productos de PCR de los genes *EPSPS1* (Glyma.01G139600.1) y *EPSPS3* (Glyma.03G027400.1) de soja (variedad Jack). Se incubó el producto de PCR junto con los complejos ribonucleoproteicos (*RNPs*) pre-ensamblados (*SgRNAs* + Cas9-GFP-MBP) y se analizaron los patrones de corte por electroforesis en gel de agarosa 1 %.

11. Generación de vectores

11.1 Generación de vector binario pUB-Dest:EPSPS1_{CDS}-WT, TIPS o TIPA

La secuencia codificante del gen *EPSPS1* (Glyma.01G139600.1) fue amplificada a partir de ADNc de la variedad Jack de soja utilizando la polimerasa Phusion HF (Thermo, Cat. F530L), empleando los *primers forward* 5'-TTTGTGACATGGCCCAAGTGAGCAGAG-3' y *reverse* 5'-TGCGGCCGCTTAGTGCTTTGTTAACCTC-3' y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El fragmento de PCR fue digerido con las enzimas *Sall* y *NotI* y fue clonado en los sitios *Sall* y *NotI* en el vector de entrada pENTR2B (pENTR2B:EPSPS1_{CDS}).

Sobre el vector pENTR2B:EPSPS1_{CDS} se introdujeron mutaciones TIPS (*primers forward* 5'-CTGGTAtTGCAATGCGTtCTTTGACAGCAGCTG-3' y *reverse* 5'-GTCAAAGaACGCATTGCAaTACCAGCATTTCC-3') o TIPA (*primers forward* 5'-CTGGTAtTGCAATGCGTgCTTTGACAGCAGCTG-3' y *reverse* 5'-GTCAAAGcACGCATTGCAaTACCAGCATTTCC-3') mediante mutagénesis QuickChange (Liu & Naismith, 2008) utilizando la polimerasa Phusion HF (Thermo, Cat. F530L) y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las variantes mutantes TIPS y TIPA, así como la versión *wild type* (WT) de la EPSPS1 fueron subclonados en un vector binario para transformación vegetal, pUB-Dest (Grefen *et al.*, 2010) mediante recombinación LR (Invitrogen, Cat 11791020). El vector pUB-Dest permite la expresión constitutiva de los genes de interés bajo el control de un promotor de poliubiquitina de *A. thaliana* (pUB-Dest:EPSPS1_{CDS}-WT, TIPS o TIPA).

11.2 Generación de vectores multipropósito PiLuCasRED_GW/AS para edición génica mediante el sistema *CRISPR/Cas9*

La secuencia codificante para la proteína *SpCas9* optimizada para su expresión en soja y bajo control del promotor CaMV35S (*GmCas9*) fue tomada del vector Cas9MDC123 (Michno *et al.*, 2015) y clonada entre los sitios *HindIII* y *EcoRI* en el vector pZH2B (Kuroda *et al.*, 2011), generando el vector pZH2B-*GmCas9*. Este vector permite la expresión de la higromicina fosfotransferasa bajo el control del promotor CaMV35S.

Se diseñó una secuencia de ADN conteniendo dos bloques: 1) un *scaffold* de *SgRNA* modificado para permitir el clonado de los adaptadores entre dos sitios *AarI* y 2) un *cassette* de *Gateway*, lacUV5:*CcdB*, donde es posible introducir la secuencia de los moldes para realizar reemplazo alélico mediante recombinación LR. Esta secuencia fue sintetizada por la empresa Macrogen y clonada en un vector pUC57 flanqueada por sitios de restricción *EcoRI* (pUC57-SgRNA_GW).

El vector pUC57-SgRNA_GW fue digerido con las enzimas *AfeI* y *SnaBI* para escindir el *cassette* de *Gateway*, obteniendo un vector pUC57-SgRNA_AS. En este vector se mantiene un sitio *MluI* de corte único, que permite el clonado de los moldes para realizar reemplazo alélico mediante restricción.

Los *cassettes* SgRNA_GW y SgRNA-AS fueron clonados en el sitio *EcoRI* en el vector pZH2B-*GmCas9*, generando los vectores pZH2B-*GmCas9*-SgRNA_GW y pZH2B-*GmCas9*-SgRNA_AS, de ahora en más PiLuCas_GW y PiLuCas_AS.

Sobre estos vectores se introdujo la secuencia codificante para el gen reportero *DsRED*. Para ello, se amplificó por PCR el gen *DsRED* a partir del vector pHairyRED (*Lin et al., 2011*) utilizando la polimerasa Phusion (Thermo, Cat. F530L) empleando los *primers forward* 5'- TGGCGCGCCGGATCAGATTGTCGTTTCC – 3' y *reverse* 5' – TTTACGCGTCACTGATAGTTTAATTCCCGATC – 3' y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El fragmento de PCR fue digerido con las enzimas *AscI* y *MluI* y fue clonado en el sitio *MluI* en los vectores PiLuCas_GW y PiLuCas_AS, originando los vectores PiLuCasRED_GW y PiLuCasRED_AS.

11.3 Generación de vectores multipropósito PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS_{TIPSKK} para reemplazo alélico

Para la generación de las construcciones para evaluar el reemplazo alélico, se procedió a incorporar sobre el vector PiLuCasRED_AS la secuencia del adaptador seleccionado dentro del *scaffold* del *SgRNA* (5'- GGGGGATTGTTTCCCACTAGTA – 3') y la secuencia con homología a la EPSPS1 donde se incorporaron las mutaciones TIPS o TIPA y la mutación sinónima K-K (EPSPS-TIPS/TIPA-KK), flanqueada por la secuencia de reconocimiento para la Cas9 (protoespaciador + PAM).

En primer lugar, se digirió el vector PiLuCasRED_AS con la enzima *AarI* siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se hibridaron los *primers forward* 5' – ATTGGGGATTGTTTCCCACTAGTA – 3' y *reverse* 5' – AAATACTAGTGGGAAACAATCCC – 3' y se ligaron utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Thermo, Cat. EL0019), generando el vector PiLuCasRED_AS-TA1.

Para el clonado del molde de reemplazo, se introdujo por PCR la secuencia de reconocimiento para la Cas9 (protoespaciador + PAM) sobre la secuencia del molde generada en el vector pCRII EPSPS-TIPS/TIPA-KK. Para ello se utilizó los *primers forward* 5' - AGGCGCGCCGGGATTGTTTCCCACTAGTAAGGGTATTATTCTGTGAAATGAAGC – 3' y *reverse* 5' – TTAACGCGTGGGATTGTTTCCCACTAGTAAGGTTTGAACTGAGGTTTTGAAGGG – 3' y la polimerasa Nzytaq II (Nzytech, Cat. MB35401), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El producto de PCR fue digerido

con las enzimas *Ascl* y *MluI* y clonado en el sitio *MluI* dentro del vector PiLuCasRED_AS-TA1, originando el vector PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS_{TIPSKK}.

12. Transformación de plantas

12.1 Transformación de *A. thaliana*

Las plantas transgénicas de *A. thaliana* fueron generadas mediante transformación floral de acuerdo al protocolo descrito por *Clough & Bent, 1998*.

12.2 Agroinfiltración de *N. benthamiana*

Plantas de *N. benthamiana* fueron cultivadas en las condiciones descritas en el *Punto 1* hasta tener unas 6 semanas. La transformación transitoria de las hojas se realizó de acuerdo al protocolo descrito en *Norkunas et al., 2018*. Las plantas infiltradas fueron incubadas por dos días en condiciones óptimas de crecimiento y luego, las hojas fueron evaluadas bajo microscopía de fluorescencia.

12.3 Transformación de cotiledones de soja mediante *A. rhizogenes* para la generación de hairy-roots

La transformación de cotiledones de soja fue realizada siguiendo el protocolo descrito en *Cho et al., 2000*. Una semana previa a la transformación, se esterilizaron semillas de soja sumergiéndolas en isopropanol 70 % por 30 segundos, seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 10 % por 5 minutos. Pasado este tiempo, se realizaron al menos 3 lavados con H₂O-miliQ estéril durante 1 minuto cada uno. Las semillas se colocaron sobre placas con papel filtro humedecido con medio Hairy Root Growth (HRG, ½ sales MS + B5, 30 g/L Sacarosa, pH 5.8; en el caso de medio sólido: 2 g/L gelrite) y se mantuvieron en oscuridad, a 22 °C, por 3 días. Posteriormente se colocaron bajo lámparas de LED con una intensidad lumínica de 100 µmol fotones m⁻² seg⁻¹, un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad a 22 °C entre 4 y 7 días.

Dos días previos a la transformación, se crecieron bacterias *A. rhizogenes* con las construcciones deseadas en las condiciones establecidas en el *Punto 2*.

El día de la transformación, se resuspendieron las bacterias estriadas en buffer PB (0.01 M Na₂HPO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.5, acetosiringona 100 µM) a una DO₆₀₀ de 0.5-0.8. Se removió la cutícula y se cortó el hipocótilo, manteniendo 2 mm. Se cortó la semilla por el eje embrionario y se removieron los primordios de hojas. Posteriormente, se humedeció el bisturí en la suspensión bacteriana y se hicieron

pequeños cortes en la cara abaxial del cotiledón y en el hipocótilo. Los explantes se colocaron boca abajo sobre papel de filtro humedecido en medio ½ MS líquido con agregado de acetosiringona 100 µM. Las placas se mantuvieron en oscuridad, a 22 °C, por 3 días. Posteriormente, se traspasaron los cotiledones a placas de medio HRG sólido, suplementado con timentina 500 µg/mL con la cara interna hacia arriba y se colocaron bajo lámparas de LED con una intensidad lumínica de 100 µmol fotones m⁻² seg⁻¹, un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad y a 22 °C hasta generar suficientes *hairy-roots* (1-3 semanas).

13 Genotipado de *hairy-roots* de soja

Se analizó la presencia de mutaciones en los *hairy-roots* transformados con la construcción piLuCasRED_AS-TA1. Para ello, se realizaron extracciones de ADN (*Punto 3*) de las *hairy-roots* que exhibieron señal del reportero *DsRED*. Se amplificaron fragmentos de aproximadamente 1800 *bp* conteniendo la región blanco para la edición, empleando la polimerasa Nzytaq II (Nzytech, Cat. MB35401) y los *primers forward* 5' - GTATTATTCTGTGAAAATGAAGC - 3' y *reverse* 5' – TTTGGAACTGAGGTTTTGAAGGG – 3', siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los productos obtenidos fueron enviados a MacroGen para su secuenciación por Sanger.

Resultados

Caracterización de las variantes TIPS y TIPA de la EPSPS1 de soja en *Arabidopsis thaliana*

Con el objetivo de optimizar metodologías de edición génica basadas en la recombinación homóloga en soja (*Glycine max*), se buscó un sistema modelo que permitiera identificar y seleccionar fácilmente el fenotipo de los eventos editados. Para ello, se propuso utilizar como secuencia genómica blanco un gen que codifica para una 5-enolpiruvatoshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), enzima involucrada en la resistencia al herbicida glifosato. El trabajo parte de la premisa de que las mutaciones TIPS (Thr102-Ile + Pro106-Ser) o TIPA (Thr102Ile + Pro106-Ala) (generadas previamente sobre el gen *EPSPS1* de soja), producen una variante de la enzima EPSPS, resistente al glifosato. La EPSPS es una enzima muy conservada que participa en la síntesis de aminoácidos aromáticos, siendo el blanco de la acción del herbicida glifosato. Existen variantes mutantes de genes *EPSPS* que están bien caracterizadas en diferentes especies de plantas (*Lolium multiflorum*, *Eleusine indica* y *Amaranthus tuberculatus*) y que son insensibles a glifosato. Estos antecedentes permitieron el diseño y generación de una variante mutada del gen *EPSPS1* de soja, conteniendo las mutaciones TIPS o TIPA. Las variantes resultantes fueron introducidas en *A. thaliana* para evaluar la funcionalidad de la enzima.

Con el objetivo de determinar si las mutaciones TIPS (Thr102-Ile + Pro106-Ser) o TIPA (Thr102Ile + Pro106-Ala) sobre la *EPSPS1* de soja, generadas por mutagénesis *in vitro*, confieren insensibilidad al herbicida glifosato, se generaron plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan de manera constitutiva cada una de las versiones mutadas, así como la versión silvestre de la enzima, bajo el control del promotor de ubiquitina de *A. thaliana* (pUB-DEST, Grefen et al., 2010; Figura 3.A) (Punto 11.1).

Para generar las líneas estables, tras la transformación floral mediada por *A. tumefaciens* las semillas obtenidas (T0) fueron seleccionadas sobre placas de medio ½ MS con agregado de glufosinato de amonio. Para analizar la presencia de la construcción en las líneas transgénicas, se germinaron las semillas en placas de medio ½ MS con agregado de glufosinato de amonio y se transfirieron a turba. Se realizaron extracciones de ADN genómico (Punto 3) y se analizó la presencia del transgén *EPSPS1* (Glyma.01G139600) mediante PCR (Figura 3.B). Las líneas obtenidas fueron sometidas a dos rondas de selección mediante pulverización con glufosinato de amonio hasta la obtención de la generación T3.

Los niveles de expresión del transgén se analizaron mediante RT-PCR semicuantitativo. Para ello, se germinaron las líneas transgénicas de *A. thaliana* en placas de medio ½ MS con agregado de glufosinato de amonio y se transfirieron a turba. Se realizó la extracción de ARN total y la síntesis de ADNc de acuerdo

a lo establecido en el *Punto 5*. La secuencia codificante del gen *EPSPS1* (Glyma.01G139600.1) fue amplificada a partir del ADNc y la cantidad de transcrito se normalizó en relación al gen de actina (AT3G18780) (*Punto 6*). Todas las líneas analizadas poseen expresión constitutiva del transgén, pero mostraron poseer una acumulación comparativamente menor respecto a lo observado para el gen de referencia (actina) (*Figura 3.C*). Para las líneas transformadas con la versión silvestre de la enzima (EPSPS_{WT}) se seleccionaron las líneas L-3 y L-4, en el caso de las líneas transformadas con la versión TIPS (EPSPS_{TIPS}) se seleccionaron las líneas L-1 y L-6, y para las líneas transformadas con la versión TIPA (EPSPS_{TIPA}), se seleccionó la línea L-4. En el caso de la línea L-10 transformada con la EPSPS_{TIPA} no se observó acumulación de transcrito (*Figura 3.C*).

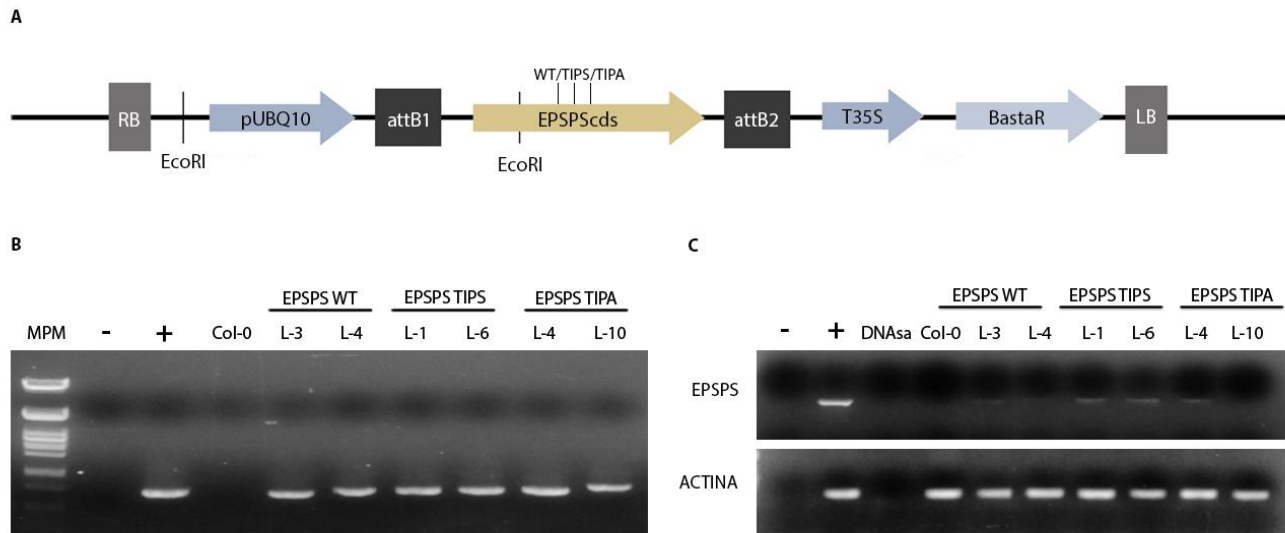


Figura 3. (A) Esquema de la construcción del vector binario pUB-Dest. La secuencia codificante del gen *EPSPS1* de soja queda bajo el control de un promotor pUBQ10 de *Arabidopsis thaliana* y el terminador CaMV35S. Se muestran las mutaciones TIPS (Thr102-Ile + Pro106-Ser) o TIPA (Thr102Ile + Pro106-Ala) o la versión silvestre (WT) de la enzima. El gen fosfinotricina acetiltransferasa (BastaR) confiere resistencia a glufosinato de amonio en planta. Los bordes derecho (RB) e izquierdo (LB) permiten la transformación vegetal mediada por *A. tumefaciens*. Se muestran los sitios *attB1* y *attB2* obtenidos tras la recombinación LR. **(B) Análisis de presencia del transgén en líneas de *Arabidopsis thaliana* mediante PCR.** Electroforesis en gel de agarosa 1 % de la amplificación por PCR a partir de extracciones de ADN genómico de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas. Se observan bandas del tamaño esperado de 723 bp. (-) control negativo, (+) control positivo (vector pUB-Dest:EPSPS_{1cds}TIPS). MPM: marcador de peso molecular (λ PstI). **(C) Análisis de expresión de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* mediante RT-PCR semicuantitativo.** Electroforesis en gel de agarosa 1 % de la amplificación por RT-PCR a partir de ADNc de plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas a 30 ciclos (tamaño esperado del amplicón: 723 bp). La cantidad de transcrito se normalizó en relación al transcrito de actina (AT3G18780, gel inferior, tamaño 120 bp). (-) control negativo, (+) control positivo, DNasa: muestra tratada con DNasa sin retrotranscribir. MPM: marcador de peso molecular (λ PstI).

1. Análisis fenotípicos de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

Para el análisis de sensibilidad de líneas transgénicas al herbicida glifosato se realizaron ensayos en placa y en tierra. Para los ensayos en placa, plantas transgénicas de *A. thaliana* de la generación T3 fueron germinadas en placas de medio ½ MS con agregado de 20 mM glufosinato de amonio (*Punto 7*). Posteriormente, las plantas fueron transferidas a placas de medio ½ MS con agregado de 15 mM glifosato (*Figura 4.A*). En estos ensayos en placa, se observó que la sensibilidad de las plantas, tanto transgénicas como no-transgénicas, al herbicida fue alta, mostrando una reducción del crecimiento de la raíz y de la parte aérea, así como síntomas de senescencia respecto a la condición control (*Figura 4.A*). Sin embargo, no fue posible observar diferencias entre los diferentes genotipos. Por ese motivo, se decidió evaluar el fenotipo de plantas en estadíos posteriores de crecimiento como se realizó en *Sammons et al. 2018*.

Para los ensayos en tierra, plantas transgénicas de *A. thaliana* de la generación T3 fueron germinadas en placas de medio ½ MS con agregado de 20 mM glufosinato de amonio y luego transferidas a turba hasta que comenzaran a desarrollar botones florales. Una vez llegado a este estadío, se pulverizaron las plantas con distintas concentraciones de glifosato (*Punto 7*) (*Figura 4.B*). En esta condición, las plantas mostraron una disminución considerable en la formación de botones florales (*Figura 4.B*).

Para el análisis de rendimiento (*Punto 8*), las semillas de plantas individuales fueron colectadas y pesadas para evaluar el rendimiento de cada planta (*Figura 4.C*). Aunque no se observaron diferencias significativas en el rendimiento entre las líneas transgénicas y las plantas Col-0, ni en la condición control ni en el tratamiento con glifosato, prácticamente no hubo plantas Col-0 que produjeran semillas, mientras que las líneas transgénicas EPSPS_{WT}, EPSPS_{TIPS} y EPSPS_{TIPA} sí produjeron un cierto número de semillas en presencia del herbicida glifosato. Esto podría interpretarse como una tendencia. Por otra parte, las plantas que expresan constitutivamente la EPSPS silvestre (EPSPS_{WT}) no mostraron diferencia en relación a aquellas que poseen las variantes de la enzima EPSPS_{TIPS} o EPSPS_{TIPA} (*Figura 4.C*).

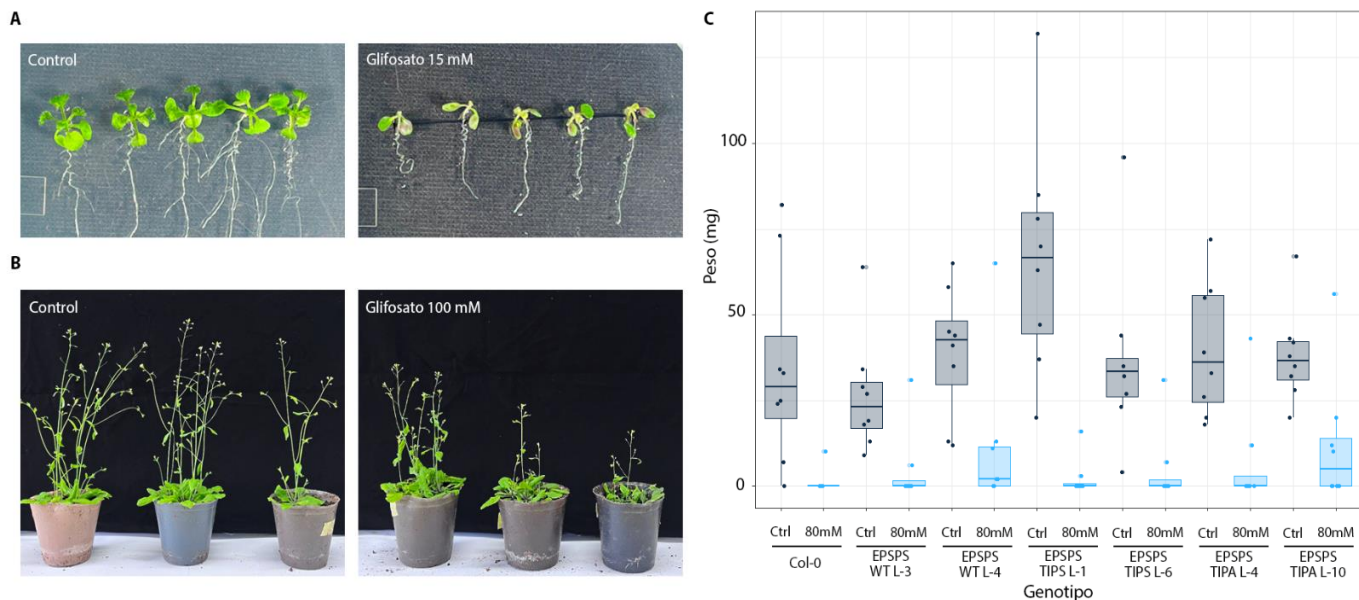


Figura 4. Análisis fenotípico de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* (A) **Ensayo de sensibilidad en placa al herbicida glifosato.** Plantas de 7 días de crecimiento en medio ½ MS con agregado de 20 mM de glufosinato de amonio fueron transferidas a placas con medio ½ MS con agregado de glifosato 15 mM durante una semana (imagen derecha). En la imagen izquierda se muestran plantas sin agregado de glifosato (control). (B) **Ensayo de sensibilidad en tierra al herbicida glifosato.** Plantas de 7 días de crecimiento en medio ½ MS con agregado de 20 mM de glufosinato de amonio fueron transferidas a turba y luego pulverizadas con glifosato 100 mM y crecidas durante 10 días (imagen derecha). En la imagen izquierda se muestran plantas pulverizadas con H₂O destilada (control). (C) **Gráfico de rendimiento frente al herbicida glifosato.** Plantas de 7 días de crecimiento en medio ½ MS con agregado de 20 mM de glufosinato de amonio fueron transferidas a turba y luego pulverizadas con glifosato 80 mM (tratamiento) o H₂O destilada (control). Las semillas obtenidas fueron colectadas y pesadas para evaluar el rendimiento. Se utilizaron 8 plantas por condición (control/tratamiento) de cada línea (Col-0 (control) y transgénicas).

Desarrollo de herramientas para edición génica en soja

1. Generación de vectores multipropósito PiLuCasRED AS/GW para edición génica mediante el sistema CRISPR/Cas9.

En plantas y animales la reparación mediada por *NHEJ* es la preferencialmente empleada para reparar los daños en el ADN, haciendo que las estrategias de inserción o modificación genética dirigida (de tipo reemplazo alélico, *knock-in* o *GT*) sean desafiantes (Huang & Puchta, 2019). Para promover el reemplazo alélico en el genoma de una célula vegetal, se debe desencadenar un mecanismo de reparación del ADN vía *HR*. Para promover la *HR*, deben darse dos condiciones: la generación de un *DSB* en el genoma, preferentemente cercano al sitio donde se quiere producir la modificación y, por otro lado, la presencia de un molde de ADN con homología de secuencia con la región donde ocurrió el *DSB* (aproximadamente 1000 bp hacia cada lado). En este sentido, era necesario generar una herramienta que incluyera las

secuencias que permitieran la expresión de la proteína Cas9 y de un *SgRNA* que promovieran la formación de un *DSB* sobre el gen *EPSPS1* de soja, así como un sitio donde fuera posible incorporar un molde que pudiera ser utilizado durante la reparación de dicho *DSB*.

En segundo lugar, el diseño del vector incluyó un sistema de fácil clonado de adaptadores con la secuencia guía de los *SgRNAs*. En muchos vectores disponibles para expresión del sistema *CRISPR/Cas9*, la incorporación de los *cassettes* de expresión de *SgRNAs* se realiza secuencialmente: primero se clonan las secuencias guía en forma de adaptadores dentro de uno o varios vectores pequeños que contienen la secuencia *scaffold* del *SgRNA*, así como el promotor U3 o U6, y luego éstos se subclonan en un vector más grande (que puede ser binario), que contiene el módulo de expresión de Cas9 y el *cassette* de selección de los eventos transformados. Muchas veces también, estas etapas requieren del uso de metodologías de clonado elaboradas, como LR múltiple (*Gateway*) o *Gibson Assembly*. En este trabajo nos propusimos generar vectores en los que se puedan clonar directamente los adaptadores codificantes de la secuencia guía del *SgRNA*, en la construcción final, de manera de tener una herramienta que nos permitiera rápidamente y sin mucho tiempo de clonado evaluar *SgRNAs* en planta.

Para ello, se sintetizó la secuencia correspondiente al *scaffold* de *SgRNA*, conteniendo en el extremo 5' de esta secuencia, dos sitios de corte para la enzima de restricción de tipo SII *AarI*. El sitio de corte para esta enzima es mucho menos frecuente que otras enzimas de restricción de tipo SII comunes, como *BbsI* o *BsaI*, cuyos sitios de restricción abundan en las construcciones finales, por ejemplo, dentro de la secuencia codificante para Cas9, pero también dentro de otros sitios de las construcciones.

Con este diseño, es posible clonar el adaptador directamente en el sitio *AarI* del vector final, mediante el agregado de las secuencias ATTG y CAAA en los extremos 5' de los oligonucleótidos sentido y antisentido, respectivamente. Por su parte, si se desea incorporar múltiples *SgRNAs* dentro de la construcción, nuestro diseño permite el ensamblado de varios *SgRNAs* mediante un clonado secuencial, empleando como estrategia la compatibilidad de extremos entre las enzimas de restricción *Ascl* y *MluI*.

En segundo lugar, el diseño del vector incluyó un sistema para incorporar la secuencia del ADN molde de reemplazo, con homología al sitio donde se pretende editar el genoma. Para ello, se emplearon dos estrategias para facilitar el clonado de esta secuencia. En primer lugar, se generó el vector PiLuCasRED_AS en el cual es posible utilizar el único sitio *MluI* presente en el vector para clonar directamente el molde de reemplazo por restricción. En este caso, el molde de reemplazo debe ser flanqueado por sitios *MluI* y/o *Ascl*. Por otro lado, la segunda estrategia se basó en la incorporación secuencias *att* al vector, de forma tal de permitir el clonado del molde mediante *Gateway*, por

recombinación LR. Este vector se denominó PiLuCasRED_GW. Para este caso, el molde de reemplazo debe incorporarse en un vector de entrada para *Gateway* (pENTR). Esta estrategia puede utilizarse en el caso de que el molde de reemplazo que se busca incorporar no pueda ser clonado por restricción en el vector final PiLuCasRED.

El tercer aspecto que se abordó fue que el vector fuera de utilidad para la transformación estable de soja por cualquiera de las metodologías más comunes, es decir, tanto por biolística como mediada por *Agrobacterium*. La resistencia a higromicina es eficiente para regenerar eventos a partir de bombardeo de embriones somáticos (Finer, 2016) así como para la regeneración de brotes a partir de cotiledones transformados con *Agrobacterium* (Olhoft et al., 2003). Es por este motivo que se optó por generar un vector binario que tuviera como sistema de selección en plantas la resistencia a higromicina.

Finalmente, era de esperar que los eventos de reparación mediante *HR* ocurrieran en baja frecuencia. Por este motivo, decidimos emplear un sistema de transformación transitorio que nos permitiera de manera rápida obtener un buen número de eventos editados sobre los cuales poder evaluar la eficiencia del reemplazo alélico in vivo. Este sistema fue el de generación de *hairy-roots* mediado por *Agrobacterium rhizogenes*. El empleo de este sistema hizo necesaria la incorporación de un gen reportero para la selección de aquellas raíces que incorporaron el *T-DNA* del vector binario. Optamos por utilizar el marcador *DsRED* el cual tenía sustento en la literatura para este tipo de aplicación (Lin et al., 2011).

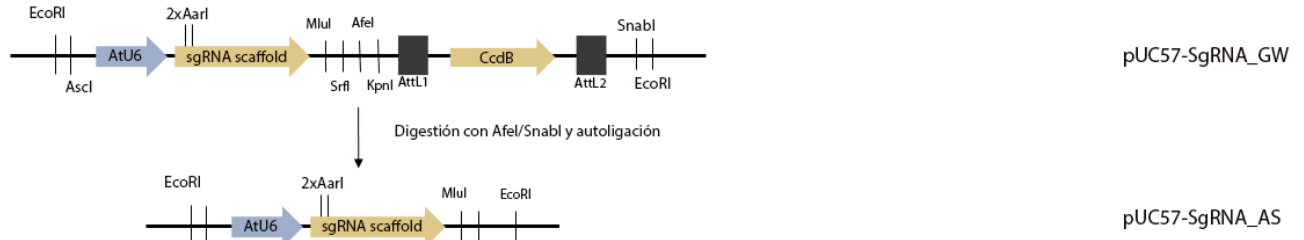
De manera resumida, los vectores PiLuCasRED_AS/GW (Punto 11.2) contienen:

- 1) el *scaffold* del *SgRNA* conteniendo dos sitios de corte para la enzima de restricción de tipo SII *AarI* para el clonado del adaptador flanqueado por los sitios *Ascl* y *MluI* que facilitan el clonado de múltiples *SgRNAs*,
- 2) un sitio para el clonado del molde de reemplazo mediante recombinación LR (*attR1-ccdB-attR2*, PiLuCasRED_GW) o por restricción dentro del sitio *MluI* (PiLuCasRED_AS),
- 3) la secuencia codificante para la proteína Cas9 optimizada para la expresión en soja (pCas9MDC123, Michno et al., 2015),
- 4) un *cassette* de resistencia a higromicina adecuado para la transformación de embriones somáticos y cotiledones de soja (pZH2B, Kuroda et al., 2011),
- 5) las secuencias de borde derecho e izquierdo, necesarias para la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o *rhizogenes* (pZH2B, Kuroda et al., 2011), y
- 6) un gen reportero *DsRED*, para la selección de eventos transformantes (pHairyRED, Lin et al., 2011).

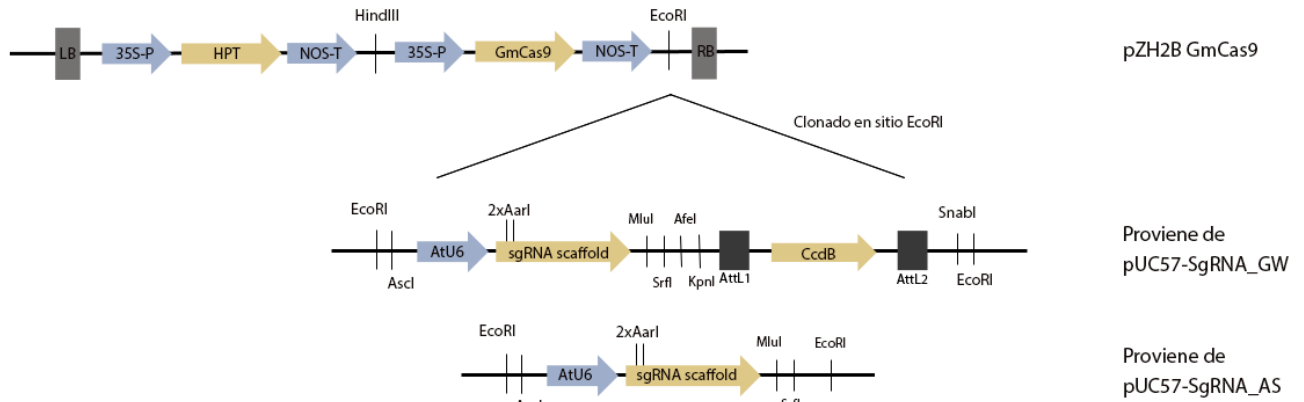
En la *Figura 5.A* se detalla el procedimiento de la generación de los vectores y en la *Figura 5.B* se muestran las construcciones finales de *PiLuCasRED_AS/GW*. En el anexo se ponen a disposición las secuencias completas de las construcciones generadas.

A

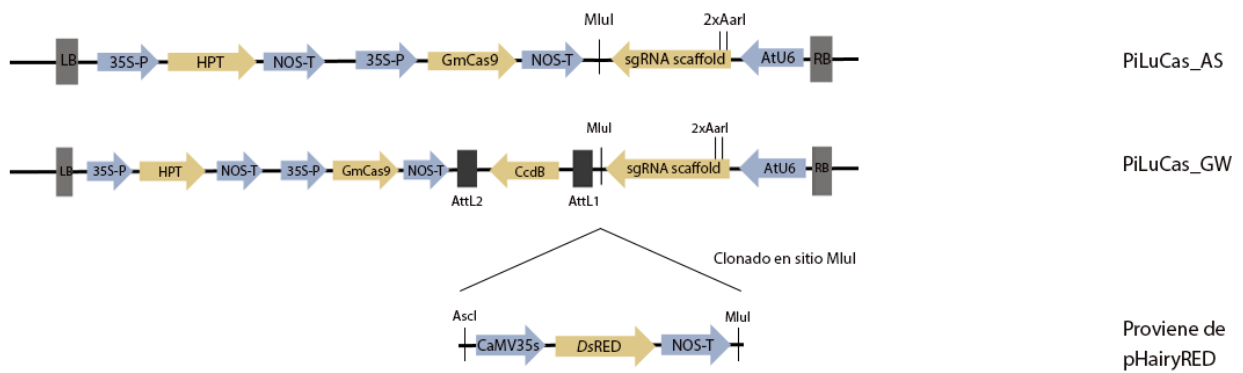
Paso 1



Paso 2



Paso 3



B

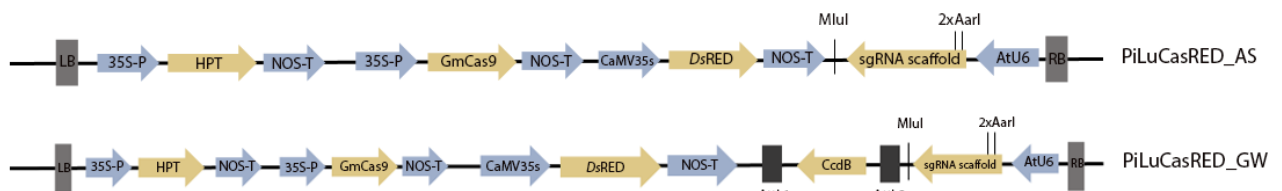


Figura 5. Construcción de los vectores multipropósito PiLuCasRED_AS/GW para edición génica. (A) Paso 1) Se diseñó una secuencia de ADN conteniendo dos bloques; un *scaffold* de *SgRNA* modificado para permitir el clonado de los adaptadores entre dos sitios *AarI* y un *cassette* de *Gateway*, lacUV5:CcdB, donde es posible introducir la secuencia de los moldes para realizar reemplazo alélico mediante recombinación LR. Esta secuencia fue sintetizada por MacroGen y clonada en un vector pUC57 (pUC57-SgRNA_GW). Posteriormente, pUC57-SgRNA_GW fue digerido con las enzimas *AfeI* y *SnaBI* para generar el vector pUC57-SgRNA_AS, en el cual se mantiene un sitio *MluI* de corte único, que permite el clonado de los moldes para realizar reemplazo alélico mediante restricción. **Paso 2)** Los *cassettes* SgRNA_GW y SgRNA-AS fueron clonados en el sitio *EcoRI* en el vector pZH2B-GmCas9, generando los vectores PiLuCas_GW y PiLuCas_AS. El vector pZH2B-GmCas9 permite expresar la proteína SpCas9, optimizada para su expresión en soja y bajo control del promotor CaMV35S (*GmCas9*) y, a su vez, expresar la higromicina fosfotransferasa bajo el control del promotor CaMV35S. **Paso 3)** Se amplificó por PCR el *cassette* del gen reportero *DsRED* (obtenido del vector pHairyRED) y digerido con las enzimas *AscI* y *MluI*. El fragmento fue clonado en el sitio *MluI* en los vectores PiLuCas_GW y PiLuCas_AS, originando los vectores PiLuCasRED_GW y PiLuCasRED_AS. **(B)** Esquema de los vectores binarios PiLuCasRED_AS/GW conteniendo secuencias optimizadas para la expresión en leguminosas.

2. Evaluación de los vectores PiLuCasRED_AS/GW en sistemas de expresión transitoria

Una vez generados los vectores multipropósito PiLuCasRED_AS y PiLuCasRED_GW, se evaluó la funcionalidad de la proteína marcadora (*DsRED*) mediante transformación transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* (Punto 12.2) (Figura 6.A). Asimismo, se evaluaron ambos vectores mediante la transformación transitoria mediada por *A. rhizogenes* (*hairy-roots*) en cotiledones de soja (Punto 12.3), confirmando la utilidad de la señal de *DsRED* para determinar la presencia de raíces transgénicas en las plantas transformadas (Figura 6.B).

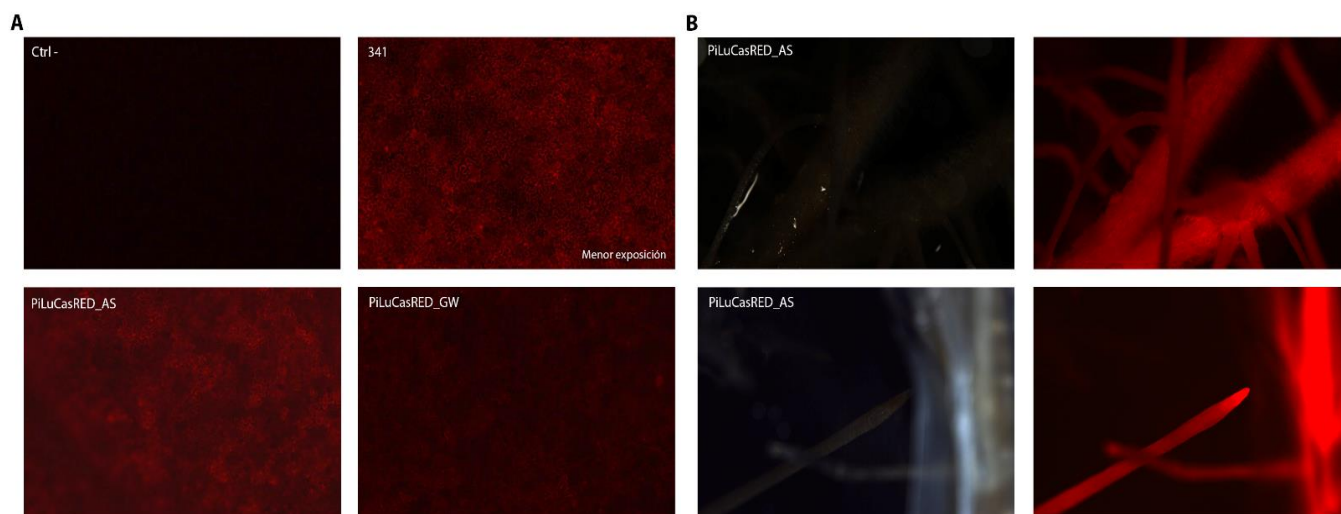


Figura 6. (A) Hojas de *Nicotiana benthamiana* transformadas con las construcciones PiLuCasRED_AS y PiLuCasRED_GW e incubadas durante 2 días. Ctrl -: hoja sin transformar; 341: vector binario conteniendo el gen “calcineurin binding protein” (CBL6) fusionado a RFP monomérica (CBL6-RFP, marcador de tonoplasto), PiLuCasRED_AS y PiLuCasRED_GW. **(B)** *Hairy-roots* generados tras la transformación utilizando el vector PiLuCasRED_AS. Las fotografías fueron obtenidas utilizando un estereomicroscopio Axio Zoom.V16 (Zeiss).

3. Transformación y edición génica del gen *EPSPS1* con el vector PiLuCasRED AS TA1 en *hairy-roots* de soja

Con el fin de promover la edición del gen *EPSPS1* de soja, se diseñaron tres *SgRNAs* (*SgRNA-1*, *SgRNA-4* y *SgRNA-11*), los cuales generarían un corte muy cerca del sitio donde se quieren introducir las mutaciones TIPS y TIPA (*Punto 10, Figura 7.A y C*). Para comprobar la eficacia de los *SgRNAs* para generar cortes en la secuencia blanco, se realizaron ensayos de corte *in vitro*, utilizando la proteína Cas9-GFP-MBP y los *SgRNAs* obtenidos mediante transcripción *in vitro*. Los *SgRNAs* fueron ensamblados con Cas9-GFP-MBP y las *RNPs* resultantes fueron utilizadas para analizar la capacidad de cortar el gen *EPSPS1*. Para ello, se utilizaron como sustrato los productos de PCR amplificados a partir de ADN genómico del cultivar Jack del gen *EPSPS1*. Se observó que los tres *SgRNAs* diseñados promueven el corte en el gen de la *EPSPS1* por la proteína Cas9 (*Figura 7.B*) y se seleccionó el *SgRNA-1* para continuar por ser el más cercano al sitio donde se desea incorporar las mutaciones TIPS o TIPA.

Para evaluar la eficiencia de corte y edición en planta, se clonó el adaptador seleccionado (*SgRNA-1*) en el vector PiLuCasRED_AS entre los sitios 2xAarI (*Figura 8. Paso 2*) (*Punto 11.3*) y se transformaron cotiledones de soja (cultivar Jack) mediante *A. rhizogenes* para la generación de *hairy-roots* (*Punto 12.3*). Se realizó extracción de ADN de las raíces con señal fluorescente (*Punto 3*), se amplificó el locus *EPSPS1* por PCR, y se realizó secuenciación por Sanger para determinar la presencia de picos mezclados (*Punto 13*). La presencia de picos mezclados puede hacer referencia a la presencia de múltiples alelos en el gen, siendo coherente con eventos editados en heterocigosis. En la *Figura 7.D*, se muestran algunos ejemplos de cromatogramas que permitieron detectar eventos de edición en raíces transformadas. En estos experimentos se observó una eficiencia de corte del 77 % (*Tabla 2*).

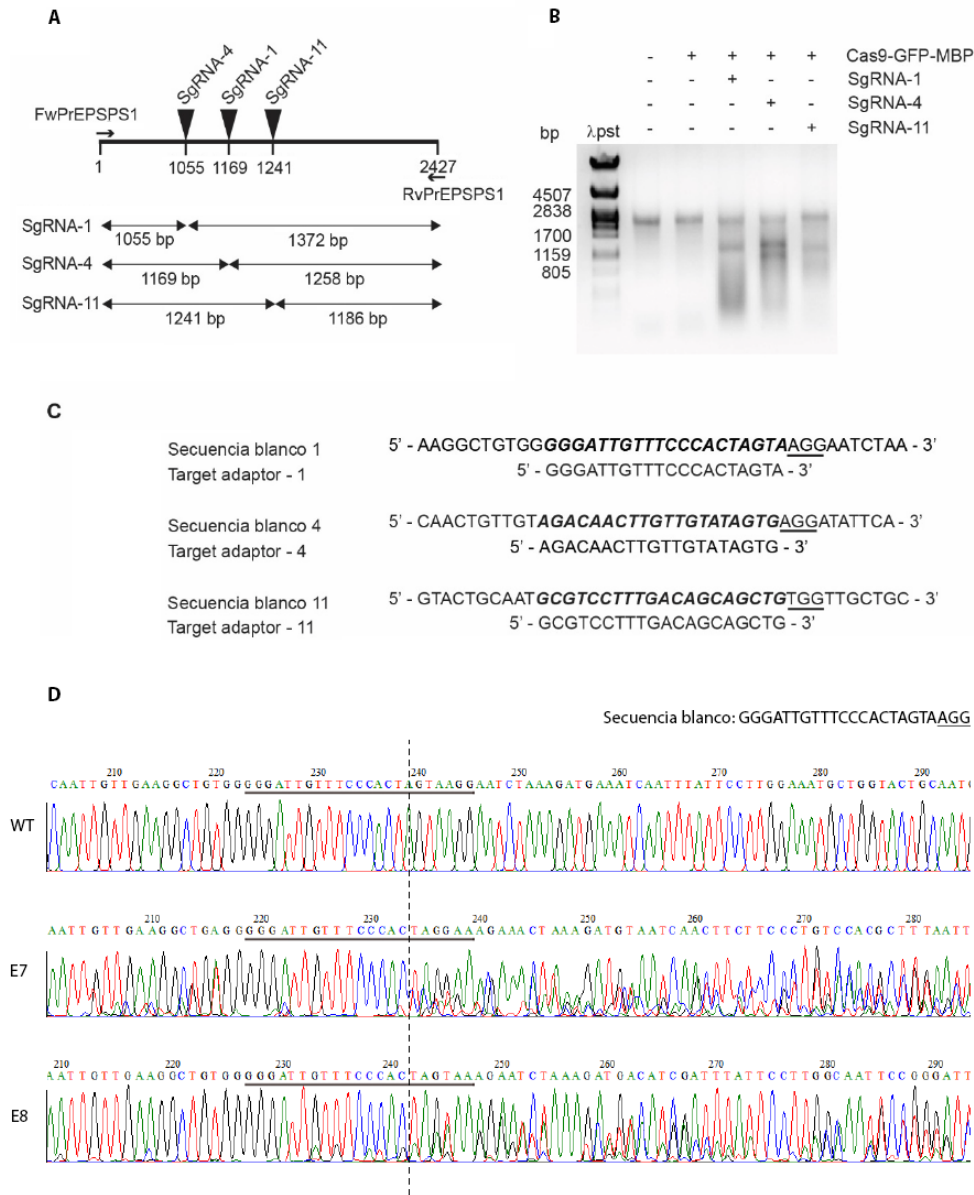


Figura 7. Ensayos de corte *in vitro* (A) Representación esquemática de la secuencia genómica blanco (gen *EPSPS1* (Glyma.01G139600.1) de *Glycine max*), indicando la posición de los tres *SgRNAs* diseñados (*SgRNA-1*, *SgRNA-4*, *SgRNA-11*) en la secuencia blanco y los tamaños esperados de los fragmentos de ADN después del corte. (B) Ensayo de corte *in vitro* de los tres *SgRNAs*. Se amplificó por PCR un fragmento de 2427 bp correspondiente al gen *EPSPS1* (Glyma.01G139600.1), a partir de ADN genómico de soja utilizando cebadores FwPrEPSPS1 y RPrEPSPS1. El producto se incubó con *SpCas9*-GFP-MBP en presencia (+) o ausencia (-) de *SgRNA*. MPM: marcador de peso molecular (λPstI). (C) Secuencias blanco y secuencia guía de los *SgRNAs* (Target adaptor). Las secuencias PAM se encuentran subrayadas. (D) Genotipado de *hairy-roots* de soja. Resultados de secuenciación de *hairy roots* transformadas con el vector PiLuCasRED_AS_TA1 mediante *A. rhizogenes* para detectar eventos de edición génica. Se muestra la región blanco del *SgRNA* utilizado (*SgRNA-1*; GGGATTGTTTCCCACTAGTAAGG), la secuencia PAM correspondiente (AGG) y con línea punteada el sitio de corte de la proteína Cas9. El clon E7 y E8 poseen un patrón correspondiente a un evento de edición en comparación con la secuencia no editada (WT) del gen *EPSPS1*.

4. Generación de vectores multipropósito PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS_{TIPSKK} para reemplazo alélico en soja

Con el objetivo de evaluar la eficiencia de reemplazo alélico en soja con las herramientas generadas en el marco de este trabajo, se generó una construcción génica en el vector PiLuCasRED_AS, conteniendo el molde EPSPS_{TIPSKK} para reemplazar la versión *wild-type* del gen *EPSPS1* de soja. El diseño del molde se realizó teniendo en cuenta las siguientes características:

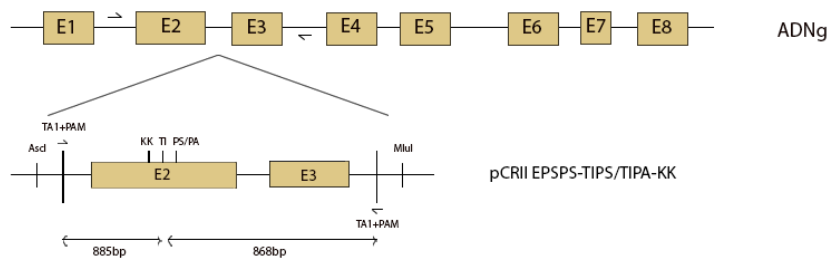
- 1) presencia de un fragmento largo (2000 bp) con homología de secuencia con el gen *EPSPS1*,
- 2) presencia de las mutaciones que se desean introducir (TIPS o TIPA),
- 3) ausencia de la secuencia de reconocimiento compatible con el *SgRNA* diseñado, de forma que el complejo Cas9-*SgRNA* no pueda actuar sobre el molde para la reparación una vez que se produzca el reemplazo alélico en la planta.

Para la producción del molde de reemplazo, inicialmente se clonó un fragmento de ADN genómico de la *EPSPS1* de soja amplificado por PCR en el vector pCRII (pCRII-EPSPS). Una vez obtenida la construcción pCRII-EPSPS se introdujeron por PCR las mutaciones de interés TIPS o TIPA mediante tecnología *QuickChange*, generando el vector pCRII-EPSPS-TIPS/TIPA.

Por otro lado, es importante que una vez que se produzca el reemplazo, el sistema *CRISPR/Cas9* no permanezca actuando sobre el genoma editado. Por este motivo, se introdujo por PCR una mutación silenciosa lisina-lisina (K-K) en la secuencia PAM asociada al *SgRNA-1*, generando el vector pCRII-EPSPS-TIPS/TIPA-KK (*Figura 8. Paso 1*).

Para incorporar el molde de reemplazo al vector PiLuCasRED_AS-TA1, se introdujo por PCR la secuencia de reconocimiento para la Cas9 (protoespaciador + PAM, TA1+PAM) sobre la secuencia del molde generada en el vector pCRII EPSPS-TIPS/TIPA-KK. El producto de PCR fue digerido con las enzimas *Ascl* y *MluI* y clonado en el sitio *MluI* dentro del vector PiLuCasRED_AS-TA1, originando el vector de reemplazo PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS_{TIPSKK} (*Figura 8. Paso 3*) (*Punto 11.3*). Al incorporar las secuencias de reconocimiento para la proteína Cas9 en el molde de reemplazo, se busca que en el momento en que la proteína Cas9 y el *SgRNA-1* se expresen, produzcan el corte sobre el genoma y también en sitios de reconocimiento del *SgRNA* que ubican flanqueando la secuencia de ADN molde, liberando un molde de ADN lineal que pueda ser empleado para la reparación.

Paso 1



Paso 2



Paso 3

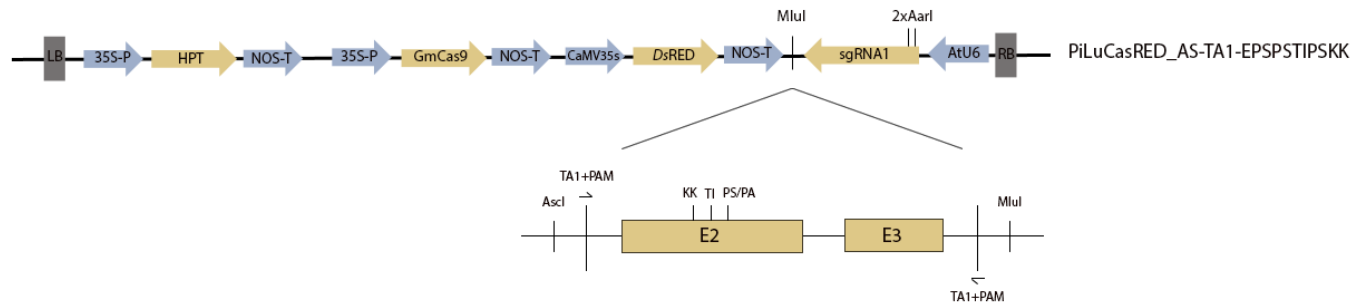


Figura 8. Construcción del vector PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPSTIPSKK para reemplazo alélico. Paso 1) Diseño y generación del molde para reemplazo alélico. Se muestra la estructura del gen *EPSPS1* de soja conteniendo 8 exones (E1-E8). A partir de la secuencia genómica del gen *EPSPS1* se amplificó un fragmento por PCR y se clonó en el vector pCRII (pCRII-EPSPS). El sitio de corte del *SgRNA*-1 se encuentra aproximadamente en medio de este fragmento. Posteriormente, se introdujeron por PCR las mutaciones de interés TIPS (Thr102-Ile + Pro106-Ser) o TIPA (Thr102Ile + Pro106-Ala) en el vector, generándose pCRII-EPSPS-TIPS/TIPA. Se introdujo una mutación silenciosa lisina-lisina (K-K) en la secuencia PAM asociada al *SgRNA*-1 generándose pCRII-EPSPS-TIPS/TIPA-KK. **Paso 2)** Se incorporó sobre el vector PiLuCasRED_AS la secuencia del adaptador seleccionado (*SgRNA*-1) dentro del *scaffold* del *SgRNA* mediante digestión con la enzima *AarI*, generando el vector PiLuCasRED_AS-TA1. **Paso 3)** Se introdujo por PCR la secuencia de reconocimiento para la Cas9 (protoespaciador + PAM) sobre la secuencia del molde generada en el vector pCRII EPSPS-TIPS/TIPA-KK. El producto de PCR fue digerido con las enzimas *Ascl* y *MluI* y clonado en el sitio *MluI* dentro del vector PiLuCasRED_AS-TA1, originando el vector PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPSTIPSKK.

Para evaluar la eficiencia de edición génica vía *HR* en soja, se utilizó un sistema de expresión transitoria basado en la transformación de soja con *A. rhizogenes* para la generación de *hairy-roots* (Punto 12.3). Para ello, se transformaron cotiledones de soja (cultivar Jack) con el vector multipropósito para reemplazo PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPSTIPSKK.

Se realizó extracción de ADN de las raíces con señal fluorescente (*Punto 3*), se amplificó el locus *EPSPS1* por PCR, y se realizó secuenciación por Sanger para determinar la presencia de las mutaciones TIPS en el gen endógeno *EPSPS*. (*Punto 13*). En estos experimentos se observó la presencia de picos mezclados en un 60 % de los eventos con señal de fluorescencia (*Tabla 2*). Para determinar si entre las modificaciones obtenidas se obtuvo algún evento de reemplazo, se intentó deconvolucionar las señales mezcladas empleando los recursos web DSDecoder (*Liu et al., 2015*) y CRISPR ID (*Dehairs et al., 2016*). Sin embargo, no fue posible mediante esta metodología determinar si los eventos editados mantenían características de reemplazo alélico.

Por este motivo, se diseñó una estrategia de genotipado por PCR para posterior caracterización de estos eventos, que permitiera detectar posibles eventos de reemplazo alélico, aunque estos sean minoritarios (*Punto 13*). Se diseñaron dos pares de primers, dos en exones y dos en intrones, por fuera de los sitios de recombinación, con el fin de evaluar qué tipo de mecanismo de reparación se ejecutó, si existió reemplazo completo (*HR*) o parcial (*NHEJ* y *HR*) (*Figura 9*). El ensayo de transformación se repitió y ahora se cuenta con doce eventos más para analizar a la brevedad.

Tabla 2. Eventos evaluados para edición génica a partir de ADN de *hairy-roots* transformadas

# Evento	Vector utilizado	DsRED	Edición	Reemplazo
E1	PiLuCasRED_AS	✓	✓	-
E2	PiLuCasRED_AS	✓	✓	-
E4	PiLuCasRED_AS	✓	✓	-
E6	PiLuCasRED_AS	✓	✗	-
E7	PiLuCasRED_AS	✓	✓	-
E8	PiLuCasRED_AS	✓	✗	-
E9	PiLuCasRED_AS	✓	✓	-
E10	PiLuCasRED_AS	✓	✓	-
E11	PiLuCasRED_AS	✓	✓	-
HR-TIPS-1	PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS _{TIPSKK}	✓	✓	?
HR-TIPS-2	PiLuCasRED_AS-TA1EPSPS _{TIPSKK}	✓	✓	?
HR-TIPS-3	PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS _{TIPSKK}	✓	✗	-

HR-TIPS-4	PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS _{TIPSKK}	✓	✓	?
HR-TIPS-5	PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS _{TIPSKK}	✓	✗	-
	Total:	14/14	10 eventos confirmados 4 eventos negativos	3 eventos a evaluar

Notas: **E1-E8:** eventos de edición utilizando el vector PiLuCasRED_AS. **HR-TIPS-X.X:** Eventos de edición y reemplazo utilizando el vector PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS_{TIPSKK}.

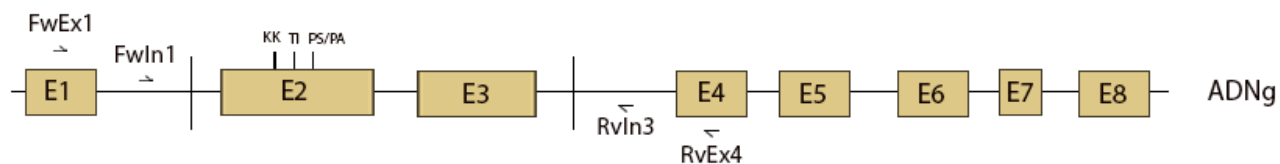


Figura 9. Estrategia de genotipado para eventos de reemplazo alélico. Esquema de la estructura del gen *EPSPS1* (Glyma.01G139600.1) de *Glycine max* posterior al reemplazo alélico. Se muestran ocho exones (E1-E8), los sitios con las mutaciones TIPS (Thr102-Ile + Pro106-Ser) o TIPA (Thr102Ile + Pro106-Ala) y K-K (E2). Se diseñaron dos juegos de *primers* para PCR por fuera de los sitios de recombinación, un juego posicionado en exones (FwEx1 y RvEx4) y uno en intrones (FwIn1 y RvIn3). Los productos de PCR obtenidos a partir de ADN de *hairy-roots* transformadas serán secuenciados por Sanger para detectar eventos de reemplazo alélico.

Discusión

1. Caracterización de los mutantes TIPS y TIPA de la EPSPS1 de soja en *Arabidopsis thaliana*

La EPSPS (5-enolpiruvatoshikimato-3-fosfato sintasa) es la sexta enzima en la ruta metabólica del shikimato y es esencial para la síntesis de aminoácidos aromáticos. En plantas, esta enzima se localiza en los cloroplastos y en otros plástidos (Garg *et al.*, 2014).

La EPSPS cataliza la transferencia del grupo enolpiruvato presente en el fosfoenolpiruvato (PEP) hacia la molécula de shikimato-3-fosfato (S3P), formando 5-enolpiruvato-3-shikimato fosfato (EPSP) y liberando fosfato inorgánico. Las EPSPSs son proteínas formadas por dos dominios globulares similares. El sitio activo de la enzima se localiza en el surco inter-dominio, donde se unen los sustratos S3P y PEP (Schönbrunn *et al.*, 2001). El herbicida glifosato es un inhibidor competitivo de la enzima EPSPS al unirse al sitio de unión del PEP (Healy-Fried *et al.*, 2007). La unión de este compuesto a EPSPS puede interrumpir la síntesis de aminoácidos aromáticos, provocando la muerte de la planta (Schönbrunn *et al.*, 2001).

Este trabajo parte de la hipótesis que al sustituir la EPSPS silvestre (EPSPS_{WT}) por una versión insensible al herbicida, las plantas obtenidas serán resistentes al glifosato. Esta estrategia simplifica la detección de las plantas editadas ya que confiere un marcador fenotípico fácil de detectar. Tiene la ventaja adicional de que los mecanismos de resistencia al glifosato están bien caracterizados (Sammons & Gaines, 2014) lo que sustenta la estrategia planteada. Las mutaciones TIPS (Thr102-Ile + Pro106-Ser) y TIPA (Thr102-Ile + Pro106-Ala) en esta región confieren insensibilidad al glifosato al mismo tiempo que permiten que la enzima mantenga inalterada la afinidad por el PEP (Healy-Fried *et al.*, 2007). Además, estas mutaciones son dominantes, dado que basta con una copia del gen con este tipo de mutaciones, para conferir tolerancia al herbicida.

Actualmente, el único cultivar que posee una doble mutación con estas características es el maíz. El evento se denominó “GA21” y consta de la sobreexpresión del gen *EPSPS* de maíz con las mutaciones TIPS, comenzando a comercializarse en 1998 (Sammons *et al.*, 2018). Según la ISAAA, al 2024 existen 53 eventos aprobados con GA21, todos en maíz (ISAAA, 2024). Sin embargo, esta estrategia para conferir insensibilidad mediante sobreexpresión de la enzima EPSPS con variantes mutantes no se ha logrado obtener en otros cultivares, incluida la soja. En *Glycine max* la estrategia predominante para conferir resistencia al glifosato es la sobreexpresión del gen *CP4* (*Agrobacterium*), resistente a la inhibición por glifosato (ISAAA, 2024).

En soja existen dos genes codificantes para EPSPSs los cuales se encuentran en los cromosomas 1 (Glyma.01G139600.1) y 3 (Glyma.03G027400.1). Ambas copias comparten un 90 % de identidad de secuencia aminoacídica entre sí. Análisis *in silico* de la expresión de los genes *EPSPS1* y *EPSPS3*, determinan que ambos genes poseen niveles de expresión similares en diferentes órganos y etapas del desarrollo (*Figura 2*). Se escogió trabajar con el gen *EPSPS1* debido a que éste presenta un nivel de expresión en hojas levemente superior al de *EPSPS3*, siendo el glifosato un herbicida de acción foliar.

Nuestra estrategia de trabajo parte de la base de que al producir las sustituciones TIPS o TIPA en el gen *EPSPS1* de soja obtendremos plantas resistentes al glifosato. Si bien las EPSPSs son proteínas con alto grado de conservación, al momento no se han producido estas variantes en la EPSPS de soja. Por este motivo, en primera instancia se debe evaluar si estas mutaciones verdaderamente generan una variante de la EPSPS de soja que sea insensible a la inhibición por este herbicida. Con el fin de analizar *in vivo* si las mutaciones logran conferir insensibilidad al herbicida, se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan de forma constitutiva las variantes mutantes TIPS (EPSPS_{TIPS}), TIPA (EPSPS_{TIPA}) o la versión silvestre (EPSPS_{WT}) de la EPSPS de soja. Para evaluar si existe una resistencia al herbicida se llevaron a cabo análisis de presencia del transgén y posteriormente análisis de expresión mediante RT-PCR. A partir de estos datos, se realizaron ensayos de sensibilidad y rendimiento en presencia del herbicida glifosato.

A partir de los resultados obtenidos (*Figuras 3 y 4*) se pudo determinar que la expresión constitutiva de todas las formas de la enzima de soja (EPSPS_{TIPS}, EPSPS_{TIPA} o EPSPS_{WT}) confieren resistencia al glifosato en comparación con las plantas Col-0. Sin embargo, no se detectó una diferencia significativa en rendimiento entre EPSPS_{WT} y EPSPS_{TIPS} o EPSPS_{TIPA}.

El grupo de Sammons (Monsanto, MO, EEUU) ha sido el único en realizar estudios similares a los nuestros en *Arabidopsis thaliana*. En dicho trabajo, se reporta la obtención de plantas transgénicas con resistencia al herbicida glifosato mediante la expresión del gen propio de *Arabidopsis* conteniendo las mutaciones TIPA (*AtEPSPS_{TIPA}*) bajo el control de su propio promotor (*Sammons et al., 2018*). Los autores mostraron que la magnitud de la resistencia al herbicida era directamente dependiente del número de copias del transgén presente (*Sammons et al., 2018*). Cabe destacar que en el trabajo mencionado no se realiza una comparación de la resistencia con plantas de *A. thaliana* transformadas con copias adicionales de la enzima silvestre, por lo que no queda del todo claro si el aumento de la resistencia de las plantas que los autores observan es debido a la expresión de la variante TIPA de la enzima o simplemente por el aumento de número de copias. El mecanismo de resistencia por duplicación de genes es un mecanismo

poco estudiado entre las poblaciones de plantas resistentes al glifosato, pero ha sido observado para algunas especies del género *Amaranthus*, *Lolium* y *Kochia* (Sammons & Gaines, 2014).

En nuestro trabajo, observamos que los tratamientos con glifosato producen una disminución del número de botones florales y pérdida de la producción de semillas en comparación con los casos control, acorde a lo reportado. Asimismo, podemos afirmar que la expresión heteróloga de las diferentes variantes de la EPSPS1 de soja produjo un aumento de la resistencia al glifosato en la condición evaluada (glifosato 80 mM). Esto puede querer decir que estamos ante un mecanismo de resistencia por aumento del número de copias de *EPSPS*, al igual, quizás, que en el trabajo de Sammons *et al.*, 2018. En nuestro trabajo, por otra parte, no observamos diferencias significativas en la producción de semillas entre las plantas transformadas con las variantes EPSPS_{WT} o EPSPS_{TIPS/TIPA}. Esto puede querer decir que las mutaciones no produjeron una ventaja en la inhibición con glifosato respecto a la versión silvestre, aunque para afirmar esto sería necesario medir la constante de inhibición *in vitro*. También es posible que la concentración de glifosato empleada haya sido demasiado elevada, alcanzando a inhibir a todas las variantes, eclipsando diferencias más sutiles. Para confirmar esto, sería necesario repetir estos experimentos utilizando un rango más saturado de concentraciones de glifosato.

Otro punto a mejorar podría ser el uso de otro promotor en nuestra construcción que permita un mayor nivel de expresión del transgén. En nuestro laboratorio hemos observado que utilizar el promotor pUBI10 de *Arabidopsis*, a pesar de tratarse de un promotor constitutivo, no nos permite obtener niveles elevados de expresión. La utilización de un promotor más fuerte, como el CaMV 35S, permitiría aumentar los niveles de expresión del transgén y así obtener mejor rendimiento en las plantas en presencia del herbicida glifosato, partiendo de un mejor punto a partir del cual realizar la comparación entre las variantes. Sin embargo, es importante destacar que en soja buscamos modificar el gen nativo, sin alterar su propio promotor o el número de copias, por lo que cualquier estrategia basada en una modificación en los niveles de expresión de la enzima no permitiría evaluar directamente la validez del sistema en soja. Asimismo, aunque la prueba de concepto en *Arabidopsis*, los resultados obtenidos utilizando este sistema no anulan nuestra estrategia de reemplazo alélico en soja.

2. Desarrollo de herramientas para edición génica en soja

Las metodologías de edición génica más difundidas para su uso en plantas se basan en la generación de un corte de doble o simple hebra del ADN, en una o varias regiones específicas, el cual, al ser reparado por la maquinaria celular de reparación del daño en el ADN, puede dar lugar a distintos tipos

de alteraciones en la secuencia blanco (*Bao et al., 2019*). Utilizando metodologías de edición génica, es posible modificar la expresión de genes alterando las secuencias promotoras (*Elison et al., 2017*), o bien realizar estudios funcionales sobre genes no codificantes, como aquellos que controlan la expresión de pequeños ARNs (*Zhou et al., 2017*). Otra posibilidad que ofrece el uso de estas tecnologías tiene que ver con la inserción sitio-específica de una secuencia (*KI*), o el reemplazo de una secuencia por otra (*gene targeting*). Dentro de las metodologías de edición génica, el sistema *CRISPR/Cas9* sigue siendo el sistema más utilizado en la actualidad (*Alamillo et al., 2023*).

En plantas, la estrategia más común para introducir el sistema *CRISPR/Cas* a las células vegetales, es mediante la transformación de plantas con construcciones génicas que permitan la expresión de los componentes del sistema dentro de las células vegetales. En plantas, una vez que se produce la modificación esperada, la construcción puede ser eliminada del genoma por retrocruza con un individuo no transgénico o por autofecundación y segregación, seleccionando las plantas que contienen la modificación y carecen de la construcción génica (*Bao et al., 2019*).

Una vez generado el corte por la nucleasa Cas9, el *DSB* puede ser reparado mediante *NHEJ* o por *HR*. La reparación por *HR* suele ser menos frecuente en células somáticas, y depende de la presencia de una secuencia con homología con la región dañada (*Kim & Kim, 2014*). Estas características particulares de la reparación vía *HR* hacen más complejos los abordajes de edición génica basados en estos mecanismos de reparación.

En este sentido, nuestro trabajo busca generar herramientas para optimizar metodologías de reemplazo alélico en soja, actualmente no disponibles. Para ello se generaron vectores multipropósito (serie PiLuCas) que fueron utilizados para transformar raíces de soja de forma transitoria mediante *A. rhizogenes* y de esa manera evaluar la factibilidad y eficiencia de obtención de eventos de reemplazo alélico.

Se generó un nuevo sistema de vectores para la edición génica en soja PiLuCasRED_AS/GW), que incluyen las siguientes mejoras con respecto a otros sistemas disponibles:

- 1) Practicidad para el clonado de los adaptadores correspondientes a las secuencias guía de los *SgRNA*, directamente en un vector binario,
- 2) Facilidad para el clonado (por *Gateway* o por restricción) de la secuencia homóloga (molde reparador), con un sistema para su escisión in vivo en el núcleo de células transformadas,
- 3) Sistema de monitoreo por fluorescencia de las células transformadas.

Los vectores PiLuCasRED_AS/GW (Figura 5) fueron utilizados para ensayos de expresión transitorios en dos sistemas diferentes, *Nicotiana benthamiana* y *hairy-roots* de soja, demostrando la funcionalidad de la proteína marcadora (DsRED) para detectar la presencia de células transformadas con facilidad (Figura 6). A su vez, usando el vector PiLuCasRED_AS para edición del gen *EPSPS1* de soja, se observó 77 % de edición génica por *NHEJ* (en ausencia de molde reparador), mientras que la eficiencia de reemplazo alélico (en presencia de molde reparador) no pudo ser determinada aún y será analizada a la brevedad.

En la actualidad, existen otras estrategias que pueden ser interesantes de optimizar para facilitar aún más el proceso de detección de raíces transformadas. *RUBY* es un nuevo gen reportero que convierte la tirosina en betalaina de un color rojo intenso (Niazian et al., 2022). Las raíces transformadas se pueden identificar visualmente sin ningún tratamiento químico ni equipos especiales. Otro gen reportero interesante es el *eYGFpuv*, que recientemente se ha utilizado con éxito para identificar raíces transgénicas bajo luz ultravioleta (Yuan et al., 2021).

Utilizando la construcción PiLuCasRED_AS_TA1, se transformaron cotiledones de soja para la generación de *hairy-roots* para evaluar la eficiencia de corte y edición de nuestro *SgRNA-1 in vivo* (Figura 7) sobre el gen *EPSPS1* de soja la cual fue del 77 % (Tabla 2). Si bien esta eficiencia de edición es elevada, es importante notar que se trata de un sistema transitorio. Quiere decir que de ninguna manera puede extrapolarse esta eficiencia si se realizara un ensayo de transformación estable, donde otros factores afectan la eficiencia de edición y la heredabilidad de las modificaciones obtenidas. Sin embargo, este vector, de clonado simplificado, es muy útil para evaluar nuevos *SgRNAs* in vivo, algo que no podíamos realizar en nuestro laboratorio hasta el momento. Además, en soja puede emplearse un protocolo modificado para obtener *hairy-roots* en plántines, obteniendo plantas quiméricas con parte aérea salvaje y raíces transgénicas (Kereszt et al., 2007), lo que puede ser útil, en combinación con nuestros vectores PiLuCasRED, para estudios de genética reversa sobre genes asociados a rasgos de la raíz.

Finalmente, para evaluar la factibilidad y eficiencia de la obtención de eventos de reemplazo alélico es necesario proveer un fragmento de ADN con homología al sitio blanco para que, una vez que se genere el daño, el sistema de reparación celular pueda tomarlo como molde para la reparación. Con este objetivo, se generó un molde de reemplazo para incorporar las mutaciones TIPS o TIPA en el gen *EPSPS1* de soja y se clonó en el vector PiLuCasRED_AS_TA1, generándose los vectores finales PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS_{TIPSKK} y PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS_{TIPAKK} (Figura 8). Utilizando la construcción PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS_{TIPSKK}, se transformaron cotiledones de soja mediante *A. rhizogenes* para la generación de *hairy-roots*

y a partir de estos ensayos se obtuvieron picos mezclados en 60 % de los eventos con señal de fluorescencia (*Tabla 2*). Sin embargo, no fue posible aún determinar si los eventos editados son eventos de reemplazo alélico. Si bien existen algunos recursos que permiten realizar la deconvolución de las señales mezcladas en los cromatogramas, como DSDecoder (*Liu et al., 2015*) y CRISPR ID (*Dehairs et al., 2016*), estos programas funcionan muy bien para organismos diploides, donde solamente existen dos alelos posibles para una secuencia. Aunque la soja es un organismo diploide, nuestro ensayo es transitorio. Esto condiciona que, si la edición ocurrió tempranamente en la formación del *hairy-root*, puede haber una modificación homogénea de las células de la raíz, pero si la edición ocurrió más tardíamente, puede haber grupos de células con modificaciones diferentes, o, dicho de otra manera, raíces quiméricas, con múltiples modificaciones diferentes. Atribuimos a esta situación la imposibilidad para deconvolucionar los cromatogramas mezclados.

Por este motivo, se diseñó una estrategia de genotipado por PCR para realizar la caracterización de estos eventos, que permita detectar posibles eventos de reemplazo alélico (*Figura 9*) y evaluar qué tipo de mecanismo de reparación se ejecutó, si existió reemplazo completo (*HR*) o parcial (*NHEJ* y *HR*). En nuestro caso, el proceso de identificar qué tipo de mecanismo se llevó a cabo es de vital importancia ya que en el sistema de *hairy-roots*, *HR* y *NHEJ* pueden coexistir. La presencia de ambos mecanismos, en todo caso, sería lo más esperado, considerando lo que se ha discutido anteriormente acerca de las dificultades para promover la vía *HR*. Estos análisis quedan como perspectivas de este trabajo.

El delivery del molde de homología y la obtención de cantidades suficientes del mismo, las restricciones de la vía *HR* debido a su baja frecuencia durante el ciclo celular, y las dificultades en la expresión de todos los componentes del sistema *CRISPR/Cas*, son algunos de los obstáculos que se pueden presentar. En este sentido, planteamos posibles estrategias para buscar mejorar estos aspectos y de esta forma, potenciar las posibilidades a futuro de obtener más cantidad de eventos de reemplazo alélico.

Varios estudios han demostrado que la eficiencia de *HR* o *GT* se puede aumentar bloqueando la vía *NHEJ* o bien, mejorando la eficiencia de la vía *HR* en distintos organismos (*Endo et al., 2016*). En *A. thaliana*, se ha reportado que los mutantes *KO* para los genes *ku70* y *lig4* aumentan la eficiencia hasta 19 veces (*Huang & Puchta, 2019*). De forma similar, la mutación *lig4* mejora la eficiencia de *GT* entre 2 y 3 veces en arroz (*Endo et al., 2016*). Alternativamente, la sobreexpresión de proteínas heterólogas involucradas en la reparación *HR*, como la proteína RAD54 de levadura en óvulos de *A. thaliana* aumentó 10 veces la eficiencia de *GT* en dicha especie (*Huang & Puchta, 2019*). Sin embargo, estudios en células animales mostraron que el bloqueo total de la vía *NHEJ* no siempre conduce a una mejor eficiencia (*Huang*

& Puchta, 2019). En nuestro caso, podría ser interesante incluir en las construcciones para reemplazo alélico algún *SgRNA* para editar los ortólogos de *ku70* o *lig4* de soja de forma de mejorar la eficiencia de *HR*.

Otra técnica para promover la *HR* es la sincronización celular, debido a que esta vía está activa principalmente en la fase S y fases G2 del ciclo celular (Singh *et al.*, 2023), en las que dicha vía de reparación del ADN se incrementa. Para que la sincronización ocurra se utilizan distintas drogas. El nocodazol o el hidrocloreuro ABT751 aplicados durante la fase G2/M, inhiben la polimerización de los microtúbulos. Su aplicación en células madre pluripotentes (FUCCI-H9 y hiPSC), aumentó la eficiencia de *GT* entre 3 y 6 veces (Singh *et al.*, 2023). Otros ejemplos de drogas son la lovastatina, aplicada en fase G1 o G2/M y la hidroxiurea, timidina, L-mimosina y afidicolina que se aplican en fase G1/S (Singh *et al.*, 2023).

El uso de drogas para sincronizar el ciclo celular, no parece ser muy compatible con la transformación de soja. Sin embargo, otra técnica que puede utilizarse para aumentar la tasa de *HR* es utilizar promotores específicos de línea germinal para la expresión de los componentes del sistema *CRISPR/Cas9* en particular la Cas9, en momentos más adecuados dentro del ciclo celular (Zheng *et al.*, 2020). Resulta importante explorar esta estrategia en plantas ya que existen reportes que podrían indicar que las dificultades para utilizar *CRISPR/Cas9* en tejidos embriogénicos se debe a la baja actividad de promotores constitutivos, como el CaMV35s, en óvulos y embriones (Wang *et al.*, 2015). Los promotores *DD45* (óvulos y embriones tempranos), *Yao* (brote apical y tejido meristemático activo), *Lat52* (polen) y *EC* (óvulos y embriones) pueden aumentar la frecuencia de editados en generación T2 y reducir la tasa de mutaciones somáticas (Zheng *et al.*, 2020).

Otro factor limitante para el *GT* es la entrega del molde con homología en cantidades suficientes (Wang *et al.*, 2018). Una de las metodologías utilizadas es la entrega del molde para la reparación del ADN utilizando vectores virales replicativos ectópicos de alto número de copias, basados en geminivirus (Wang *et al.*, 2018). Los geminivirus son una gran familia de virus vegetales con genomas de ADN circulares monocatenarios y una amplia variedad de huéspedes como las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Posterior a la infección, se producen grandes números de replicones por círculo rodante, que pueden servir como molde para la *HR* (Wang *et al.*, 2018). En nuestra estrategia inicial descartamos el uso de este tipo de vectores para realizar la entrega del molde de reemplazo debido a que su alto número de copias intracelular podría resultar en la incorporación no deseada al genoma, de secuencias pertenecientes al vector. Sin embargo, la eficiencia que se obtiene es bastante superior a la reportada por otras metodologías (Čermák *et al.*, 2015). El primer vector de geminivirus se desarrolló a partir del *bean*

yellow dwarf virus (BeYDV) para edición génica en tabaco. Las mutaciones puntuales resultantes en el gen *ALS* permitieron que las plantas de tabaco regeneradas adquirieran resistencia a los herbicidas (*Baltes et al., 2014*). El replicón BeYDV también se utilizó en papa, dirigido al gen *ALS1*, obteniéndose fenotipos menos susceptibles a herbicidas (*Butler et al., 2016*). El vector BeYDV también se utilizó para integrar el promotor 35S aguas arriba del gen de síntesis de antocianinas (*ANT1*) en tomate (*Čermák et al., 2015*). Utilizando este tipo de vectores la frecuencia de edición aumentó 10 veces en comparación a métodos tradicionales de delivery (*Čermák et al., 2015*).

Utilizando todas las herramientas disponibles, el trabajo futuro apuntará a seguir desarrollando estrategias con el objetivo de mejorar la eficiencia de *HR* para promover y potenciar el reemplazo alélico. A su vez, de ser exitoso el reemplazo en *hairy-roots*, buscaremos avanzar en la transformación estable de cotiledones de soja mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para determinar la factibilidad, eficiencia y heredabilidad de eventos de reemplazo alélico en plantas enteras, mediante la introducción del sistema *CRISPR/Cas9*.

Conclusiones

En este trabajo se desarrollaron una serie de herramientas con el objetivo de optimizar metodologías de edición génica en soja basadas en *HR*. Se generaron versiones mutadas de la EPSPS1 de soja y se transformaron en *A. thaliana*. Se buscó determinar que las mutaciones TIPS (Thr102-Ile + Pro106-Ser) y TIPA (Thr102Ile + Pro106-Ala) en la proteína codificada por el gen *EPSPS1* de soja, confieren insensibilidad al herbicida glifosato. Para ello, se realizaron ensayos fenotípicos para evaluar la sensibilidad y el rendimiento de las plantas transgénicas tratadas con el herbicida glifosato. Se pudo determinar que la sobreexpresión de la enzima silvestre (EPSPS_{WT}) y la presencia de variantes mutantes de la enzima (EPSPS_{TIPS} y EPSPS_{TIPA}) confieren resistencia al glifosato en comparación con líneas de ecotipo Col-0. Aunque las plantas sobreexpresantes de la EPSPS silvestre (EPSPS_{WT}) no mostraron diferencia en relación a aquellas que poseen las variantes de la enzima EPSPS_{TIPS} o EPSPS_{TIPA}, consideramos que los resultados son novedosos ya que no se ha reportado estudios de la EPSPS1 de soja en *A. thaliana*, conteniendo las mutaciones TIPS o TIPA. A futuro se buscará afinar un poco más en las condiciones evaluadas de forma de determinar si a concentraciones inferiores de glifosato es posible observar diferencias entre las variantes transformadas.

A su vez, en este trabajo se generaron vectores multipropósito (serie PiLuCas) y se puso a punto la transformación transitoria mediante *Agrobacterium rhizogenes* de manera de evaluar la factibilidad y eficiencia de obtención de eventos de reemplazo alélico. Los vectores generados son una herramienta de utilidad para evaluar nuevos *SgRNA* en planta y pueden ser empleados para el estudio de genes asociados a rasgos de la raíz. Usando estos vectores se logró promover la edición sobre la *EPSPS1* de soja con una eficiencia del 77 %.

Se generó un molde de reemplazo el cual fue clonado en el vector PiLuCasRED_AS-TA1, generando el vector de reemplazo final PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS_{TIPSKK}. Se transformaron cotiledones de soja mediante *A. rhizogenes* para la generación de *hairy-roots* y en estos experimentos se observó la presencia de picos mezclados en un 60 % de los eventos con señal de fluorescencia. A la brevedad se iniciarán las pruebas para detectar posibles eventos de reemplazo alélico y dilucidar qué mecanismo de reparación se ejecutó.

En el futuro se buscará iniciar el proceso para determinar la factibilidad, eficiencia y heredabilidad de eventos de reemplazo alélico en plantas enteras, mediante la introducción del sistema *CRISPR/Cas9* en cotiledones de soja mediante la transformación estable por *Agrobacterium tumefaciens*.

Bibliografía

- Abdul Aziz, M., Brini, F., Rouached, H., & Masmoudi, K. (2022). Genetically engineered crops for sustainably enhanced food production systems. *Frontiers in Plant Science*, 13. doi:10.3389/fpls.2022.1027828
- Abdullah, J. Z., Hong, X., Zhang, S., Yao, R., & Xiao, Y. (2020). CRISPR base editing and prime editing: DSB and template-free editing systems for bacteria and plants. *Synthetic and systems biotechnology*, 5(4), 277–292. doi:10.1016/j.synbio.2020.08.003
- Ahmad, A., Jamil, A., & Munawar, N. (2023). GMOs or non-GMOs? The CRISPR Conundrum. *Frontiers in plant science*, 14. doi:10.3389/fpls.2023.1232938
- Ahmar, S., Gill, R., Jung, K., Faheem, A., Qasim, M., Mubeen, M., & Zhou, W. (2020). Conventional and Molecular Techniques from Simple Breeding to Speed Breeding in Crop Plants: Recent Advances and Future Outlook. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). doi:10.3390/ijms21072590
- Alamillo, J. M., López, C. M., Martínez Rivas, F. J., Torralbo, F., Bulut, M., & Alseekh, S. (2023). Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein and hairy roots: a perfect match for gene functional analysis and crop improvement. *Current opinion in biotechnology*, 79. doi:10.1016/j.copbio.2022.102876
- Baltes, N. J., Gil-Humanes, J., Cermak, T., Atkins, P. A., & Voytas, D. F. (2014). DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell*, 26(1), 151-63. doi:10.1105/tpc.113.119792.
- Bao, A., Burritt, D., Chen, H., Zhou, X., Cao, D., & Tran, L. (2019). The CRISPR/Cas9 system and its applications in crop genome editing. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(3), 321-336. doi:10.1080/07388551.2018.1554621
- Barber, S. (1999). Transgenic plants and safety regulation. *Methods for Risk Assessment of Transgenic Plants*, 155-156. doi:10.1007/978-3-0348-8700-7_18
- Bawa, A. S., & Anilakumar, K. R. (2013). Genetically modified foods: safety, risks and public concerns—a review. *Journal of Food Science and Technology*, 50(6), 1035–1046. doi:10.1007/s13197-012-0899-1
- Begemann, M. B., Gray, B. N., & January, E. (2017). Precise insertion and guided editing of higher plant genomes using Cpf1 CRISPR nucleases. *Scientific reports*, 7(11606). doi:10.1038/s41598-017-11760-6
- Bhuyan, S. J., Kumar, M., Ramrao Devde, P., Rai, A. C., Mishra, A. K., Singh, P. K., & Siddique, K. H. (2023). Progress in gene editing tools, implications and success in plants: a review. *Frontiers in genome editing*, 5(1272678). doi:10.3389/fgeed.2023.127267
- Butler, N. M., Baltes, N. J., Voytas, D. F., & Douches, D. S. (2016). Geminivirus-Mediated Genome Editing in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Using Sequence-Specific Nucleases. *Frontiers in Plant Science*, 7(1045). doi:10.3389/fpls.2016.01045.
- Čermák, T., Baltes, N. J., Čegan, R., Zhang, Y., & Voytas, D. F. (2015). High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biology*, 16(232). doi:10.1186/s13059-015-0796-9.

- Chawla, R., Poonia, A., Samantara, K., Mohapatra, S., Naik, S., Ashwath, M., . . . Prasad, P. (2023). Green revolution to genome revolution: driving better resilient crops against environmental instability. *Frontiers in Genetics*, 14. doi:10.3389/fgene.2023.1204585
- Chen, H., Neubauer, M., & Wang, J. P. (2022). Enhancing HR Frequency for Precise Genome Editing in Plants. *Frontiers in plant science*, 13(883421). doi:10.3389/fpls.2022.883421.
- Cho, H. J., Farrand, S. K., Noel, G. R., & Widholm, J. M. (2000). High-efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode. *Planta*, 210(2), 195–204.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735–43. doi:10.1046/j.1365-3113x.1998.00343.x.
- Dahan-Meir, T., Filler-Hayut, S., Melamed-Bessudo, C., Bocobza, S., Czosnek, H., Aharoni, A., & Levy, A. A. (2018). Efficient in planta gene targeting in tomato using geminiviral replicons and the CRISPR/Cas9 system. *Plant Journal*, 95(1), 5–16. doi:10.1111/tpj.13932.
- Dehairs, J., Talebi, A., Cherifi, Y., & Swinnen, J. V. (2016). CRISP-ID: decoding CRISPR mediated indels by Sanger sequencing. *Scientific Reports*, 6(28973). doi:10.1038/srep28973
- Dhakate, P., Sehgal, D., Vaishnavi, S., Chandra, A., Singh, A., Raina, S. N., & Rajpal, V. R. (2022). Comprehending the evolution of gene editing platforms for crop trait improvement. *Frontiers in genetics*, 13. doi:10.3389/fgene.2022.876987
- DIEA. (2024). *MGAP, Anuario Estadístico*. Recuperado el Febrero de 2024, de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-estadistico-agropecuario-2023#>
- Dong, L., Fang, C., Cheng, Q. S., Kou, K., Kong, L., Zhang, C., . . . Liu, B. (2021). Genetic basis and adaptation trajectory of soybean from its temperate origin to tropics. *Nature communications*, 12(1). doi:10.1038/s41467-021-25800-3
- Dong, O. X., Yu, S., Jain, R., Zhang, N., Duong, P. Q., Butler, C., . . . Ronald, P. C. (2020). Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9. *Nature Communications*, 11(1). doi:10.1038/s41467-020-14981-y.
- Elison, G. L., Song, R., & Acar, M. (2017). Precise Genome Editing Method Reveals Insights into the Activity of Eukaryotic Promoters. *Cell Reports*, 18(1), 275–286. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.014
- Endo, M., Mikami, M., & Toki, S. (2016). Biallelic Gene Targeting in Rice. *Plant Physiology*, 170(2), 667–77. doi:10.1104/pp.15.01663.
- Fausser F, S. S. (2014). Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 79(2), 348–59. doi:10.1111/tpj.12554.
- Finer, J. (2016). Generation of Transgenic Soybean (*Glycine max*) via Particle Bombardment of Embryogenic Cultures. *Current Protocols*, 1(4), 592–603. doi:10.1002/cppb.20039.
- Firdous, S., Iqbal, S., Anwar, S., & Jabeen, H. (2018). Identification and analysis of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) gene from glyphosate-resistant *Ochrobactrum intermedium* Sq20. *Pest Management Science*, 74(5), 1184–1196. doi:10.1002/ps.4624.

- Fleitas, A. L., Señorale, M., & Vidal, S. (2022). A Robust Expression and Purification Method for Production of SpCas9-GFP-MBP Fusion Protein for In Vitro Applications. *Methods Protocols*, 5(3). doi:10.3390/mps5030044.
- Gaj, T., Sirk, S. J., Shui, S. L., & Liu, J. (2016). Genome-Editing Technologies: Principles and Applications. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(12). doi:10.1101/cshperspect.a023754
- Gao, C. (2021). Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell*, 184, 1621-1635. doi:10.1016/j.cell.2021.01.005
- Garg, B., Vaid, N., & Tuteja, N. (2014). In-silico analysis and expression profiling implicate diverse role of EPSPS family genes in regulating developmental and metabolic processes. *BMC Research Notes*, 7(58). doi:10.1186/1756-0500-7-58.
- Gil-Humanes, J., Wang, Y., Liang, Z., Shan, Q., Ozuna, C. V., Sánchez-León, S., . . . Voytas, D. F. (2017). High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *Plant Journal*, 89(6), 1251-1262. doi:10.1111/tpj.13446.
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., & Blatt, M. R. (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *The Plant Journal*, 64(2), 355-365. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04322.x.
- Healy-Fried, M., Funke, T., Priestman, M., Han, H., & Schönbrunn, E. (2007). Structural Basis of Glyphosate Tolerance Resulting from Mutations of Pro101 in Escherichia coli 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(45), 32949-32955. doi:10.1074/jbc.M809771200.
- Huang, T. K., & Puchta, H. (2019). CRISPR/Cas-mediated gene targeting in plants: finally a turn for the better for homologous recombination. *Plant cell reports*, 38(4), 443-453. doi:10.1007/s00299-019-02379-0
- Hummel, A. W., Chauhan, R. D., Cermak, T., Mutka, A. M., Vijayaraghavan, A., Boyher, A., . . . Taylor, N. J. (2018). Allele exchange at the EPSPS locus confers glyphosate tolerance in cassava. *Plant Biotechnology Journal*, 16(7), 1275-1282. doi:10.1111/pbi.12868.
- Hyten, D. L., Song, Q., Zhu, Y., Choi, I. Y., Nelson, R. L., Costa, J. M., . . . Cregan, P. B. (2006). Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(45), 16666-16671. doi:10.1073/pnas.0604379103.
- ISAAA. (2024). *GM Approval Database*. Recuperado el Febrero de 2024, de <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>
- Jhansi, R., & Usha, R. (2013). Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future. *Journal of Pharmacy Research*, 6(8), 879-883. doi:10.1016/j.jopr.2013.08.008
- Jung, C., & Till, B. (2021). Mutagenesis and genome editing in crop improvement: perspectives for the global regulatory landscape. *Trends in plant science*, 26(12), 1258-1269. doi:10.1016/j.tplants.2021.08.002.
- Kantor, A., McClements, M. E., & MacLaren, R. E. (2020). CRISPR-Cas9 DNA Base-Editing and Prime-Editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17). doi:10.3390/ijms21176240.

- Kereszt, A., Li, D., Indrasumunar, A., Nguyen, C. D., Nontachaiyapoom, S., Kinkema, M., & Gresshoff, P. M. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nature Protocols*, 2(4), 948-52. doi:10.1038/nprot.2007.141.
- Khan, S. H. (2019). Genome-Editing Technologies: Concept, Pros, and Cons of Various Genome-Editing Techniques and Bioethical Concerns for Clinical Application. *Molecular therapy nucleic acids*, 7(16), 326-334. doi:10.1016/j.omtn.2019.02.027
- Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J., & Kim, J. S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research*, 24(6), 1012-1019. doi:10.1101/gr.171322.113
- Kuroda, M., Kimizu, M., & Mikami, C. (2011). A simple set of plasmids for the production of transgenic plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(11), 2348-51. doi:10.1271/bbb.100465.
- Kuzma, J. (2016). Policy: Reboot the debate on genetic engineering. *Nature*, 531(7593), 165-7. doi:10.1038/531165a.
- Leth, I. K., & McDonald, K. A. (2017). Media development for large scale *Agrobacterium tumefaciens* culture. *Biotechnology Progress*, 33(5), 1218-1225. doi:10.1002/btpr.2504.
- Li, J., Meng, X., Zong, Y., Chen, K., Zhang, H., Liu, J., . . . Gao, C. (2016). Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. *Nature Plants*, 2(16139). doi:10.1038/nplants.2016.139.
- Li, X., Ma, S., Shan, N., Zhang, X., Sui, X., & Zhang, Z. (2017). A Protocol for *Agrobacterium*-mediated Transformation of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) from cotyledon explants. *Protocol Exchange*. doi:10.1038/protex.2017.107
- Li, Z., Liu, Z. B., Xing, A., Moon, B. P., Koellhoffer, J. P., Huang, L., . . . Cigan, A. M. (2015). Cas9-Guide RNA Directed Genome Editing in Soybean. *Plant Physiology*, 169(2), 960-70. doi:10.1104/pp.15.00783.
- Lin, J. J., Assad-Garcia, N., & Kuo, J. (1994). Effects of *Agrobacterium* cell concentration on the transformation efficiency of tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Focus*, 16(3), 72-77.
- Lin, M. H., Gresshoff, P. M., Indrasumunar, A., & Ferguson, B. J. (2011). pHairyRed: a novel binary vector containing the DsRed2 reporter gene for visual selection of transgenic hairy roots. *Molecular Plant*, 4(3), 537-45. doi:10.1093/mp/ssq084.
- Liu, H., & Naismith, J. H. (2008). An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnology*, 8(91). doi:10.1186/1472-6750-8-91
- Liu, W., Xie, X., Ma, X., Li, J., Chen, J., & Liu, Y. G. (2015). DSDecode: A Web-Based Tool for Decoding of Sequencing Chromatograms for Genotyping of Targeted Mutations. *Molecular plant*, 8(9), 1431-3. doi:10.1016/j.molp.2015.05.009.
- Liu, X., Zhou, X., Li, K., Wang, D., Ding, Y., Liu, X., . . . Fang, C. (2020). A simple and efficient cloning system for CRISPR/Cas9-mediated genome editing in rice. *PeerJ*, 8. doi:10.7717/peerj.8491
- Ma, X., Zhu, Q., Chen, Y., & Liu, Y. G. (2016). CRISPR/Cas9 Platforms for Genome Editing in Plants: Developments and Applications. *Molecular Plant*, 9(7), 961-974. doi:10.1016/j.molp.2016.04.009.

- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2018). Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here? *The CRISPR journal*, 1(5), 325–336. doi:10.1089/crispr.2018.0033
- Martinez-Trujillo, M., Limones-Briones, V., Cabrera-Ponce, J., & Herrera-Estrella, L. (2004). Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the flora-dip method. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 63-70. doi:10.1007/BF02773350
- McHughen, A. (2016). A critical assessment of regulatory triggers for products of biotechnology: Product vs. process. *GM crops & food*, 7((3-4)), 125-158. doi:10.1080/21645698.2016.1228516
- Metje-Sprink, J., Menz, J., Modrzejewski, D., & Sprink, T. (2019). DNA-Free Genome Editing: Past, Present and Future. *Frontiers in plant science*, 9(1957). doi:10.3389/fpls.2018.01957
- MGAP - Ministerio de Ganadería, A. y. (2024). *Decreto de regulación de editados*. Montevideo. Recuperado el Marzo de 2024
- MGAP - Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de Uruguay. (2023). *Encuesta Agrícola “Invierno 2023”*. Montevideo: DIEA.
- Michno, J. M., Wang, X., Liu, J., Curtin, S. J., Kono, T. J., & Stupar, R. M. (2015). CRISPR/Cas mutagenesis of soybean and *Medicago truncatula* using a new web-tool and a modified Cas9 enzyme. *GM Crops & Foods*, 6(4), 243-52. doi:10.1080/21645698.2015.1106063.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Naik, B. J., Shimoga, G., Kim, S. C., Manjulatha, M., Subramanyam Reddy, C., Palem, R. R., . . . Lee, S. H. (2022). CRISPR/Cas9 and Nanotechnology Pertinence in Agricultural Crop Refinement. *Frontiers in Plant Science*, 13. doi:10.3389/fpls.2022.843575
- Niazian, M., Belzile, F., & Torkamaneh, D. (2022). CRISPR/Cas9 in Planta Hairy Root Transformation: A Powerful Platform for Functional Analysis of Root Traits in Soybean. *Plants*, 11(8). doi:10.3390/plants11081044
- Nidhi, S., Anand, U., Oleksak, P., Tripathi, P., Lal, J., Thomas, G., . . . 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). doi:10.3390/ijms22073327
- Norkunas, K., Harding, R., Dale, J., & Dugdale, B. (2018). Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods*, 14(71). doi:10.1186/s13007-018-0343-2.
- Olhoft, P. M., Flagel, L. E., Donovan, C. M., & Somers, D. A. (2003). Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta*, 216(5), 723-35. doi:10.1007/s00425-002-0922-2.
- Oz, M. T., Altpeter, A., Karan, R., Merotto, A., & Altpeter, F. (2021). CRISPR/Cas9-Mediated Multi-Allelic Gene Targeting in Sugarcane Confers Herbicide Tolerance. *Frontiers in genome editing*, 3(673566). doi:10.3389/fgeed.2021.673566.
- Pagano, M. C., & Miransari, M. (2016). The importance of soybean production worldwide. *Academic Press*, 1, 1-26. doi:10.1016/B978-0-12-801536-0.00001-3.

- Pandey, R., & Saluja, D. (2017). Hydrogen peroxide agarose gels for electrophoretic analysis of RNA. *Analytical Biochemistry*(534), 24-27. doi:10.1016/j.ab.2017.07.007.
- Plan Agropecuario. (2024). *Plan Agropecuario - Informes*. Recuperado el Febrero de 2024, de <https://www.planagropecuario.org.uy/web/inicio.html>
- Pollegioni, L., Schonbrunn, E., & Siehl, D. (2011). Molecular basis of glyphosate resistance: Different approaches through protein engineering. *FEBS Journal*, 278(16), 2753-2766. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08214.x.
- Quadros, R. M., & Miura, H. H. (2017). Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins. *Genome Biology*, 18(92). doi:10.1186/s13059-017-1220-4
- Raman, R. (2017). The impact of Genetically Modified (GM) crops in modern agriculture: A review. *GM Crops & Food*, 8, 195-208. doi:10.1080/21645698.2017.1413522
- Rasheed, A., Ali Gill, R., Umair Hassan, M., Mahmood, A., Qari, S., U. Zaman, Q., . . . Wu, Z. (2021). A Critical Review: Recent Advancements in the Use of CRISPR/Cas9 Technology to Enhance Crops and Alleviate Global Food Crises. 43(3), 1950–1976. doi:10.3390/cimb43030135
- Redenbaugh, K., Hiatt, B., Martineau, B., Kramer, M., Sheehy, R., Sanders, R., . . . Emlay, D. (1992). *Safety Assessment of Genetically Engineered Fruits and Vegetables: A Case Study of the Flavr Savr Tomato*. CRC Press.
- Sainsbury, F., Thuenemann, E. C., & Lomonossoff, G. P. (2009). pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 7(7), 682-93. doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00434.x.
- Sammons, R. D., You, J., Qi, Y., Flasiński, S., Kavanaugh, C., Washam, J., . . . Heck, G. (2018). Evaluation of glyphosate resistance in *Arabidopsis thaliana* expressing an altered target site EPSPS. *Pest Management Science*, 74(5), 1174-1183. doi:10.1002/ps.4654.
- Sammons, R., & Gaines, T. (2014). Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Management Science*, 70(9), 1367-77. doi:10.1002/ps.3743
- Sandhya, D., Jogam, P., Allini, V. R., Abbagani, S., & Alok, A. (2020). The present and potential future methods for delivering CRISPR/Cas9 components in plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(25). doi:10.1186/s43141-020-00036-8
- Sauer, N. J., Narváez-Vásquez, J., Mozoruk, J., Miller, R. B., Warburg, Z. J., Woodward, M. J., . . . Gocal, G. F. (2016). Oligonucleotide-Mediated Genome Editing Provides Precision and Function to Engineered Nucleases and Antibiotics in Plants. *Plant Physiology*, 170(4), 1917-28. doi:10.1104/pp.15.01696.
- Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W. A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J. N., & Kabsch, W. (2001). Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1376-80. doi:10.1073/pnas.98.4.1376.
- Sedivy, E. J., Wu, F., & Hanzawa, Y. (2017). Soybean domestication: the origin, genetic architecture and molecular bases. *The New Phytologist*, 214(2), 539-553. doi:10.1111/nph.14418.

- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of bacteriology*, 189(23), 8746–8749. doi:10.1128/JB.01368-07
- Shan, Q. (2018). ZFN, TALEN and CRISPR-Cas9 mediated homology directed gene insertion in Arabidopsis: A disconnect between somatic and germinal cells. *Journal of genetics and genomics*, 45(12), 681-684. doi:10.1016/j.jgg.2018.07.011
- Shen, H., & Li, Z. (2022). DNA Double-Strand Break Repairs and Their Application in Plant DNA Integration. *Genes*, 13(2). doi:10.3390/genes13020322.
- Shi, J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H. R., Archibald, R. L., Yang, M., . . . Habben, J. E. (2017). ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 15(2), 207-216. doi:10.1111/pbi.12603.
- Shimatani, Z., Kashojiya, S., Takayama, M., Terada, R., Arazoe, T., Ishii, H., . . . Kondo, A. (2017). Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology*, 35(5), 441-443. doi:10.1038/nbt.3833.
- Singh, S., Chaudhary, R., Deshmukh, R., & Tiwari, S. (2023). Opportunities and challenges with CRISPR-Cas mediated homologous recombination based precise editing in plants and animals. *Plant Molecular Biology*, 111(1-2), 1-20. doi:10.1007/s11103-022-01321-5.
- Sony, S. K., Kaul, T., Motelb, K. F., Thangaraj, A., Bharti, J., Kaul, R., . . . Nehra, M. (2021). CRISPR/Cas9-mediated homology donor repair base editing confers glyphosate resistance to rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in plant science*, 14(1122926). doi:10.3389/fpls.2023.1122926.
- Stemmer, M., Thumberger, T., Del Sol Keyer, M., Wittbrodt, J., & Mateo, J. L. (2015). CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PLoS One*, 10(4). doi:10.1371/journal.pone.0124633.
- Su, W., Xu, M., Radani, Y., & Yang, L. (2023). Technological Development and Application of Plant Genetic Transformation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13). doi:10.3390/ijms241310646
- Sun, Y., Zhang, X., Wu, C., He, Y., Ma, Y., Hou, H., . . . Xia, L. (2016). Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-Mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase. *Molecular Plant*, 9(4), 628-631. doi:10.1016/j.molp.2016.01.001
- Svitashev, S., Young, J. K., Schwartz, C., Gao, H., Falco, S. C., & Cigan, A. M. (2015). Targeted Mutagenesis, Precise Gene Editing, and Site-Specific Gene Insertion in Maize Using Cas9 and Guide RNA. *Plant Physiology*, 169(2), 931-45. doi:10.1104/pp.15.00793.
- Turnbull, C., Lillemo, M., & Hvoslef-Eide, T. A. (2021). Global Regulation of Genetically Modified Crops Amid the Gene Edited Crop Boom – A Review. *Frontiers in Plant Science*, 12. doi:10.3389/fpls.2021.630396
- Uruguay XXI. (2024). *Uruguay XXI - Promoción de inversiones, exportaciones e imagen país*. Recuperado el Febrero de 2024, de <https://www.uruguayxxi.gub.uy>
- USDA. (2024). *USDA Agency Reports*. Recuperado el Febrero de 2024, de <https://www.usda.gov/media/agency-reports>

- Visarada, K., Meena, D., Cr, A., Srujana, S., Nammi, S., & Seetharama, N. (2009). Transgenic Breeding: Perspectives and Prospects. *Crop Science*, 49, 1555-1563. doi:10.2135/cropsci2008.10.0581
- Voytas, D. F. (2013). Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annual review of plant biology*, 64, 327-350. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105552.
- Vu, T. V., Sivankalyani, V., Kim, E. J., Doan, D. T., Tran, M. T., Kim, J., . . . Kim, J. Y. (2020). Highly efficient homology-directed repair using CRISPR/Cpf1-geminiviral replicon in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 18(10), 2133-2143. doi:10.1111/pbi.13373.
- Wang, M., Lu, Y., Botella, J. R., Mao, Y., & Hua, K. . (2018). Gene Targeting by Homology-Directed Repair in Rice Using a Geminivirus-Based CRISPR/Cas9 System. *Molecular Plant*, 10(7), 1007-1010. doi:10.1016/j.molp.2017.03.002.
- Wang, Z., Xing, H., Dong, L., Zhang, H., Han, C., Wang, X., & Chen, Q. (2015). Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in Arabidopsis in a single generation. *Genome Biology*, 16(1). doi:10.1186/s13059-015-0715-0
- Xing, S., Chen, K., Zhu, H., Zhang, R., Zhang, H., Li, B., & Gao, C. (2020). Fine-tuning sugar content in strawberry. *Genome Biology*, 21(1). doi:10.1186/s13059-020-02146-5.
- Xu, Y., & Zhanjun, L. (2020). CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 2401-2415. doi:10.1016/j.csbj.2020.08.031
- Yuan, G., Lu, H., Tang, D., Hassan, M. M., Li, Y., Chen, J. G., . . . Yang, X. (2021). Expanding the application of a UV-visible reporter for transient gene expression and stable transformation in plants. *Horticulture research*, 8(1). doi:10.1038/s41438-021-00663-3.
- Zhao, D., Tao, J., Han, C., & Ge, J. (2011). An actin gene as the internal control for gene expression analysis in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). *African Journal of Agricultural Research*, 7(14), 2153-2159. doi:10.5897/AJAR11.1613
- Zheng, N., Li, T., Dittman, J., Su, J., Li, R., Gassmann, W., . . . Yang, B. (2020). CRISPR/Cas9-Based Gene Editing Using Egg Cell-Specific Promoters in Arabidopsis and Soybean. *Frontiers in Plant Science*, 11(800). doi:10.3389/fpls.2020.00800
- Zhou, J., Deng, K., Cheng, Y., Zhong, Z., Tian, L., Tang, X., . . . Zhang, Y. (2017). CRISPR-Cas9 Based Genome Editing Reveals New Insights into MicroRNA Function and Regulation in Rice. *Frontiers in Plant Science*, 8(1598). doi:10.3389/fpls.2017.01598.

Anexo

1. Secuencia del fragmento sintetizado y clonado en el vector pUC57 por la empresa Macrogen

cggcgcgc¹acAAGCTTTCGTTGAACAACGGAACCTCGACTTGCCTTCCGCACAATACATCATTCTTCTTAGCTTTTTTCTTCTTC
TTCGTTTATACAGTTTTTTTTTGTATCAGCTTACATTTCTTGAACCGTAGCTTTCGTTTTCTTCTTTTAACTTTCATTTCGGAG
TTTTGTATCTTGTTCATAGTTTGTCCAGGATTAGAATGATTAGGCATCGAACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAAACATCTTC
ATTCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAAAAGGCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAGCAGGCCATTATATGGGAAAGAAC
AATAGTATTTCTTATATAGGCCCATTTAAGTTGAAAACAATCTTCAAAAGTCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAG
TTTATATACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTGaaatgcaggtgatgactcacctgcataaGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAA
TAAGGCTAGTCCGTTATCAACTGAAAAAGTGGCACCAGAGTCGGTGCTTTTTTT³Atttttttacgcgt⁴gcccgggc⁵agcgt⁶ggtacc⁷
ACAAGTTTGTACAAAAAAGCTGAACGAGAAACGTAATAATGATATAAATATCAATATATTAAATTAGATTTTGCATAAAAAACA
GACTACATAATACTGTAAAAACAACATATCCAGTCACTATG⁸GCGGCCGCATTAGGCACCCAGGCTTACACTTTATGCTTCC
GGCTCGTATAATG⁹TGTGGATTTTGTAGTTAGGATCCGTCGAGATTTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGCAGTTTAAGGTTTA
CACCTATAAAAGAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTTGTGGATGTACAGAGTGATATTATTGACACGCCCGGGGACGCGATGGTGA
TCCCCCTGGCCAGTGACGCTCTGCTGTCAGATAAAGTCCCCGTGAACCTTACCCGGTGGTGATATCGGGGATGAAAGCTGG
CGCATGATGACCACCGATATGGCCAGTGTCGGGTCTCCGTTATCGGGGAAGAAGTGGCTGATCTCAGCCACCGCGAAAAATG
ACATCAAAAACGCCATTAACCTGATGTTCTGGGGAATATAA¹⁰ATGTCAGGCTCCCTTATACACAGCCAGTCTGCAGGTCGACC
ATAGTGACTGGATATGTTGTGTTTACAGTATTATGTAGTCTGTTTTTATGCAAAATCTAATTTAATATATTGATTTTATATCA
TTTTACGTTTCTCGTTACGCTTTCTGTACAAAGTGGT¹¹TCagtacgta¹²gaattc¹³

2. Secuencia del vector multipropósito PiLuCasRED_AS

CAACCACAGGGTCCCCTCGGGGATCAAAGTACTTTAAAGTACTTTAAAGTACTTTAAAGTACTTTGATCCAACCCCTCCGCGGA
GCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCG
GAGTGTATACTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGAT
GCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGCTCGGCTCGGCTGCGGCGA
GCGGTATCAGTCACTCAAAGGCGGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG
GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGCGGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAA
AATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCG
CTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGC
TGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCCCGACCGTGTGCG
CTTATCCGGTAAGTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAG
CAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGT
ATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACACCGCTGGTAGCGG
TGGTTTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGA

¹ Sitio de restricción *AscI*

² Sitios de restricción *2x AarI*

³ *Cassette scaffold SgRNA*

⁴ Sitio de restricción *MluI*

⁵ Sitio de restricción *SrfI*

⁶ Sitio de restricción *AfeI*

⁷ Sitio de restricción *KpnI*

⁸ Sitio *attR1*

⁹ Promotor LacUV5

¹⁰ Gen *CcdB*

¹¹ Sitio *attR2*

¹² Sitio de restricción *SnaBI*

¹³ Sitio de restricción *EcoRI*

CGCTCAGTGGAACGAAAACACGTTAAGGGATTTTGGTCATGCATGATATATCTCCCAATTTGTGTAGGGCTTATTATGCACG
CTTAAAAATAATAAAAGCAGACTTGACCTGATAGTTTGGCTGTGAGCAATTATGTGCTTAGTGCATCTAATCGCTTGAGTTAAC
GCCGGCGAAGCGGCGTCGCTTGAACGAATTTCTAGCTAGACA¹⁴TATTTGCCGACTACCTTGGTGATCTCGCCTTTCACGTAGT
GGACAAATCTTCCAACGATCTGCGCGGAGGCCAAGCGATCTTCTTGTCCAAGATAAGCCTGTCTAGCTTCAAGTATGA
CGGGCTGATACTGGGCCGCGAGGCGCTCCATTGCCAGTCGGCAGCGACATCCTTCGGCGCGATTTTGGCGTTACTGCGCTG
TACCAAATGCGGGACAACGTAAGCACTACATTTGCTCATCGCCAGCCAGTCGGGCGGCGAGTTCCATAGCGTTAAGGTTTC
ATTTAGCGCCTCAAATAGATCCTGTTCAAGAACCGGATCAAAGAGTTCCTCCGCGCTGGACCTACCAAGGCAACGCTATGTTT
TCTTGCTTTTGTGAGCAAGATAGCCAGATCAATGTCGATCGTGGCTGGCTCGAAGATACCTGCAAGAATGTCATTGCGCTGCCA
TTCTCAAATTCAGTTCGCGCTTAGCTGGATAACGCCACGGAATGATGTCGTCGTGCACAACAATGGTGACTTCTACAGCGCG
GAGAATCTCGCTCTCTCCAGGGGAAGCCGAAGTTTCCAAAAGGTCGTTGATCAAAGCTCGCCGCGTTGTTTCATCAAGCCTTAC
GGTCAACGTAACCAGCAAATCAATATCACTGTGTGGCTTCAGGCCGCCATCCACTGCGGAGCCGTACAAATGTACGGCCAGCA
ACGTCGGTTCGAGATGGCGCTCGATGACGCCAACTACCTCTGATAGTTGAGTCGATACTTCGGCGATCACCGCTTCCCCAT¹⁴
GATGTTTAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTA
ACGCGCTTGCTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACCCCAAAAAACATGTCATAACAAGAAGCCATGAAAACCGCCACT
GCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGCTTACGAACC
GAACAGGCTTATGTCCACTGGGTTCTGTGCCGAATTGATCACAGGCAGCAACGCTCTGTATCGTTACAATCAACATGCTACCC
TCCGCGAGATCATCCGTGTTTCAAACCCGGCAGCTTAGTTGCCGTTCTTCCGAATAGCATCGGTAACATGAGCAAAGTCTGCCG
CCTTACAACGGCTCTCCCGCTGACGCCGTCCCGGACTGATGGGCTGCCTGTATCGAGTGGTGATTTTGTGCCGAGCTGCCGGT
CGGGGAGCTGTTGGCTGGCTGG¹⁵TGGCAGGATATATTGGTGTAAAC¹⁵AAATTGACGCTTAGACAACCTAATAACACATTGC
GGACGTTTTTAATGTACTGAATTAACGCCGAATTGCTCTAGCATTGCCATTACAGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCG
GTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTT
CCCAGTCACGACGTTGTAACGACGCGCCAGTGCCAAGCTGGCGCGCTCCCCAGATTAGCCTTTTCAATTCAGAAAAGATGC
TAACCCACAGATGGTTAGAGAGGCTTACGCAGCAGGTCTCATCAAGACGATCTACCCGAGCAATAATCTCCAGGAAATCAAAT
ACCTTCCCAAGAAGGTTAAAGATGCAGTCAAAGATTCAAGGACTAACTGCATCAAGAACACAGAGAAAGATATATTTCTCAAG
ATCAGAAGTACTATTCCAGTATGGACGATTCAAGGCTTGCTTCACAAACCAAGGCAAGTAATAGAGATTGGAGTCTCTAAAAA
GGTAGTTCCTCACTGAATCAAAGGCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAAGTTCGCCGTAAAGACTGGCGAA
CAGTTCATACAGAGTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCC
AAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAAT¹⁵TGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGG
ATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAGGAAGGTGGCTCTACAAATGCCATCATTGCGATAA
AGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGACCCCAACACGAGGAGCATCGTGGAAGAA
GAAGACGTTCCAACACGCTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCACTA
TCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGAACACGGGGGACTGTGAGATGAAAAAGCCTG
AACTCACCGCGACGTCTGTGAGAAAGTTCTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAA
GAATCTCGTGCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGCTCGGGGTAATAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGA
TCGTTATGTTTATCGGCACTTTCATCGGCCGCGCTCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAGTTCAGCGAGAGCCTGA
CCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTTACGCCGTGCG
CGGAGGTATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCA
ATACACTACATGGCGTGATTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACGTGTATGGACGACACCGTCAG
TGCGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGACGCGGATT
TCGGCTCCAACAATGTCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCAATTGACTGGAGCGAGGCGATGTTCCGGGGATTCCCA
ATACGAGGTGCGCAACATCTTCTTCTGGAGGGCGTGGTTGGCTTGATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATC
CGGAGCTTGACAGGATCGCCGCGGCTCCGGGCGTATATGCTCCGCAATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGC
AATTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTGCGGGCTACACAAA
TCGCCCGCAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAACCGACGCCCCAGCACTCG
TCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCGTCTAGTGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTA
AGATTGAATCCTGTTGCCGCTTTCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAAT
GCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGC

¹⁴ *Cassette* SpeR, aminoglicosido adenililtransferasa (resistencia a espectinomicina)

¹⁵ Borde izquierdo (LB) del T-ADN (ADN de transferencia)

GCGCAAAC TAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTA¹⁶GGCGCGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCAACATG
 GTGGAGCACGACACACTTGTCTTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAAC
 AAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAAAGGAAGGT
 GGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACC
 CCCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTG
 GAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAG
 GGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAAAGGAAGGTGGCTC
 CTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCAC
 CCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTA
 AGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACCTCGACT
 CTAGAGGATCCCCGGGTACCGGGCCCCCTCGAGGCGCGCCACCAGGTCGACATGGATAAGAAGTACTCCATCGGACTGGA
 TATCGGAACTAACTCCGTGGGATGGGCTGTGATCACTGATGAGTACAAGGTGCCATCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGAAAC
 ACTGATAGACACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCTCTGCTGTTGATTCCGGAGAGACTGCTGAGGCTACTAGACTGAA
 GAGAAGTGTAGAAGAAGATACACTAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAAGAGATCTTCTCAAACGAGATGGCTAAG
 GTGGATGATTCTTCTTCCACAGACTGGAGGAGTCTTCTGGTGGAGGAGGATAAGAAGCACGAGAGACACCAATCTTCG
 GAAACATCGTGGATGAGGTGGCTTACCACGAGAAGTACCAACTATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTGGATTCCACTGAT
 AAGGCTGATCTGAGACTGATCTACCTGGCTCTGGCTCACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAGGGAGATCTGAA
 CCCAGATAACTCCGATGTGGATAAGCTGTTTCATCCAAGTGGTGAACTTACAACCAACTGTTTCGAGGAGAACCAATCAACGC
 TTCCGGAGTGGATGCTAAGGCTATCCTGTCCGCTAGACTGTCCAAGTCCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCTCAACTGCCAG
 GAGAGAAGAAGAACGGACTGTTGCGAAACCTGATCGCTCTGTCCCTGGGACTGACTCCAACTTCAAGTCCAACCTCGATCTG
 GCTGAGGATGCTAAGCTGCAACTGTCCAAGGATACTACGATGATGATCTGGATAACCTGCTGGCTCAAATCGGAGATCAATA
 CGCTGATCTGTTCTGGCTGCTAAGAACCTGTCCGATGCTATCCTGCTGTCCGATATCCTGAGAGTGAACACTGAGATCACTAA
 GGCTCCACTGTCCGCTTCCATGATCAAGAGATACGATGAGCACCACCAAGATCTGACTCTGCTGAAGGCTCTGGTGAGACAAC
 AACTGCCAGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGATCAATCCAAGAACGGATACGCTGGATACATCGATGGAGGAGCTTCCAA
 GAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGAGAAGATGGATGGAAGTGAAGCTGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAG
 GATCTGCTGAGAAAGCAAAGAAGTTCGATAACGGATCCATCCACACCAAATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCTATCCTGAG
 AAGACAAGAGGATTTCTACCCATTCTGAAGGATAACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACTTTCAGAATCCCATACTACG
 TGGGACCACTGGCTAGAGGAACTCCAGATTGCTTGGATGACTAGAAAGTCCGAGGAGACTATCACTCCATGGAACCTCGA
 GGAGGTGGTGGATAAGGGAGCTTCCGCTCAATCCTTCATCGAGAGAATGACTAACTTCGATAAGAAGCTGCCAAACGAGAAG
 GTGCTGCCAAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACTGTGTACAACGAGCTGACTAAGGTGAAGTACGTGACTGAGGGAAT
 GAGAAAGCCAGCTTCTGTCCGAGAGCAAAAGAAGGCTATCGTGGATCTGCTGTTCAAGACTAACAGAAAGGTGACTGTG
 AAGCAACTGAAGGAGGATTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGATTCCGTGGAGATCTCCGGAGTGGAGGATAGATTCAACG
 CTTCCCTGGGAACCTACCACGATCTGCTGAAGATCATCAAGGATAAGGATTTCTGGATAACGAGGAGAACGAGGATATCCTG
 GAGGATATCGTGCTGACTCTGACTCTGTTTCGAGGATAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACTTACGCTCACCTGTTTCA
 TGATAAGGTGATGAAGCAACTGAAGAGAAGAAGATACACTGGATGGGGAAGACTGTCCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAG
 AGATAAGCAATCCGGAAAGACTATCCTGGATTTCTGAAGTCCGATGGATTTCGCTAACAGAACTTCATGCAACTGATCCACG
 ATGATTCCTGACTTTCAAGGAGGATATCCAAAAGGCTCAAGTGTCCGGACAAGGAGATTCCTGACGAGCAGCATCGCTAAC
 CTGGCTGGATCCCCAGCTATCAAGAAGGGAATCCTGCAACTGTGAAGGTGGTGGATGAGCTGGTGAAGGTGATGGGAAGA
 CACAAGCCAGAGAACATCGTGATCGAGATGGCTAGAGAGAACCAACTACTCAAAGGGACAAAAGAAGTCCAGAGAGAGA
 ATGAAGAGAATCGAGGAGGGAATCAAGGAGCTGGGATCCCAATCCTGAAGGAGCAGGAGTGGAGAACACTCAACTGCAA
 AACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAAAACGGAAGAGATATGTACGTGGATCAAGAGCTGGATATCAACAGACTGTCCG
 ATTACGATGTGGATCACATCGTGCCACAATCCTTCTGAAGGATGATTCCATCGATAACAAGGTGCTGACTAGATCCGATAAGA
 ACAGAGGAAAGTCCGATAACGTGCCATCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAAGTACTGGAGACAAGTGTGAACGCTA
 AGCTGATCACTCAAAGAAAGTTCGATAACCTGACTAAGGCTGAGAGAGGAGGACTGTCCGAGCTGGATAAGGCTGGATTAT
 CAAGAGACAAGTGGTGGAGACTAGACAAATCACTAAGCACGTGGCTCAAATCCTGGATTCCAGAATGAACACTAAGTACGAT
 GAGAACGATAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATCACTCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCAGAAAGGATTTCCAAT
 CTACAAGGTGAGAGAGATCAACAAGTACCACACGCTCACGATGCTTACCTGAACGCTGTGGTGGGAAGTGTCTGATCAAGA
 AGTACCCAAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGAGATTACAAGGTGTACGATGTGAGAAAGATGATCGCTAAGTCCGAGCA
 AGAGATCGGAAAGGCTACTGCTAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAAGTCTTCAAGACTGAGATCACTCTGGCTAACGG

¹⁶ *Cassette HygR (resistencia a higromicina)*

AGAGATCAGAAAGAGACCACTGATCGAGACTAACGGAGAGACTGGAGAGATCGTGTGGGATAAGGGAAGAGATTCGCTAC
TGTGAGAAAGGTGCTGTCCATGCCACAAGTGAACATCGTGAAGAAGACTGAGGTGCAAAGTGGAGGATTCTCAAGGAGTCC
ATCCTGCCAAAGAGAAACTCCGATAAGCTGATCGCTAGAAAGAAGGATTGGGATCCAAAGAAGTACGGAGGATTCTGATTCCC
CAACTGTGGCTTACTCCGTGCTGGTGGTGGCTAAGGTGGAGAAGGGAAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGGAGCTGCT
GGGAATCACTATCATGGAGAGATCCTCCTTCGAGAAGAACCAATCGATTTCCTGGAGGCTAAGGGATACAAGGAGGTGAAG
AAGGATCTGATCATCAAGCTGCCAAAGTACTCCCTGTTGAGCTGGAGAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCTTCCGCTGGAG
AGCTGCAAAAGGGAAACGAGCTGGCTCTGCCATCCAAGTACGTGAACCTCCTGTACCTGGCTTCCACTACGAGAAGCTGAAG
GGATCCCCAGAGGATAACGAGCAAAAGCAACTGTTCTGGAGCAACACAAGCACTACCTGGATGAGATCATCGAGCAAATCT
CCGAGTTCTCAAGAGAGTGATCCTGGCTGATGCTAACCTGGATAAGGTGCTGTCCGTTACAACAAGCACAGAGATAAGCCA
ATCAGAGAGCAAGCTGAGAACATCATCCACTGTTCACTCTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCTGCTTTCAAGTACTTCGATACT
ACTATCGATAGAAAGAGATACACTTCCACTAAGGAGGTGCTGGATGCTACTCTGATCCACCAATCCATCACTGGACTGTACGA
GACTAGAATCGATCTGTCCCAACTGGGAGGAGATCTGCAACCAAGAAGAAGAGAAAGGTGGGAGGATGATCTAGACCAGA
TTAATTAAGTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGTGGAGCTCGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCT
TAAGATTGAATCCTGTTGCCGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTA
ATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATA
GCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATC¹⁷GGGAATTCTACGCTGCCCGGGCACGCGCC
GGATCAGATTGTGTTTTCCGCTTCAGTTTACGTTTATGAGTCAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGTAA
GACTGGCGAACAGTTCATACAGAGTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCACGACACAC
TTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATGCAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGA
AACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCTACAAATGCCAT
CATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCA
TCGTGGAAGAAAGAACGTTCCAACACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCA
CAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTATTGAGAGAAACACGGGGGACTCTTGACCAT
GGTAGATCTGAGGGTAAATTTCTAGTTTTCTCCTTCAATTTCTTGGTTAGGACCCTTTCTCTTTTATTTTTTATGAGCTTTGATC
TTTCTTTAACTGATCTATTTTTAATTGATTGGTTATGGTGTAAATATTACATAGCTTTAACTGATAATCTGATTACTTTATTTCTG
TGTGTCTATGATGATGATGATAGTTACAGAACCGACGAACTAGTATGGCCTCCTCCGAGAACGTCATCACCGAGTTCATGCGCT
TCAAGGTGCGCATGGAGGGCACCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCGCCCTACGAGGGC
CACAACACCGTGAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGG
CTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCG
TGATGAACCTCGAGGACGGCGCGTGGCGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCTGCTTATCTACAAGGTGAA
GTTTCATCGGCGTGAACCTCCCTCCGACGGCCCCGTGATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGCCTG
TACCCCGCGACGGCGTGTGAAGGGCGAGACCCACAAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTC
AAGTCCATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGACGTGCCCGGCTACTACTACGTGGACGCCAAGCTGGACATCACCTCCACAA
CGAGGACTACACCATCGTGGAGCAGTACGAGCGCACCGAGGGCGGCCACCACTGTTCTGTAGCCACGTGTGAATTGGTGA
CCAGCTCGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTAT
CATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATT
AGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTC
ATCTATGTTACTAGATCGGGAATTAAGTATCAG¹⁸TGACGCGT¹⁹AAAAAAAATAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTT
TCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC²⁰TTATGCAGGTGAGTCATCACCTGCATTCA
ATCACTACTTCGACTCTAGCTGTATATAAACTCAGCTTCGTTTTCTTATCTAAGCGATGTGGGACTTTTGAAGATTGTTTTCACT
TAAATGGGCCTATATAAGAAATACTATTGTTCTTTCCCATATAAATGGGCCTGCTTCTCTTTTCAGATTCCAGGGGCGCTTTTG
AAGATTATCTTCATATCTTAAGAATGAAGATGTTTTATTCAATCAAATTCCTGAAGGTTGATGCCTAATCATTCTAATCCTGGG
ACAACTATGAAACAAGATACAAAACTCCGAATGGAAAGTAAAAAGAAGAAAACGAAAGCTACGGTTCAAGAAAATGTAA
GCTGATAAACAAAAAAACTGTATGAACGAAGAAGAAGAAAAAAGCTAAGAAGAAATGATGTATTGTGCGGAAGGCAAG
TCGAGTTCCGTTGTTCAACGAAAGCTTGTGGCGCGCCGAATTCTTAATTAACAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCTGT

¹⁷ Cassette GmCas9 optimizado para *Glycine max* (soja)

¹⁸ Cassette DsRED

¹⁹ Sitio restricción MluI

²⁰ Cassette Scaffold SgRNA

GTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGA
 GCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCC
 AACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTCCGCTTCAGTTTAACTATCAG
 TGTTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAAC²¹CTAAGAGAAAAGAGCGTTTATTAGAATAATCGGATATTTAAAAGGCGTGAA
 AAGGTTTATCCGTTCCATTTGTATGTGCATGC

3. Secuencia del vector multipropósito PiLuCasRED_GW

CAACCACAGGGTCCCCTCGGGGATCAAAGTACTTTAAAGTACTTTAAAGTACTTTAAAGTACTTTGATCCAACCCCTCCGCGGA
 GCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCG
 GAGTGTATACTGGCTTAATATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGAT
 GCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGA
 GCGGTATCAGCTCAAGGCGGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAATCATGTGAGCAAAAAG
 GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAA
 AATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACAGGCGTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCG
 CTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGC
 TGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGC
 CTTATCCGGTAATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAG
 CAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGT
 ATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCGCTGGTAGCGG
 TGGTTTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGGTCTGA
 CGCTCAGTGGAACGAAAACACGTTAAGGGATTTTGGTCATGCATGATATATCTCCAATTTGTGTAGGGCTTATTATGCACG
 CTTAAAAATAATAAAGCAGACTTGACCTGATAGTTTGGCTGTGAGCAATTATGTGCTTAGTGATCTAATCGCTTGAGTTAAC
 GCCGGCGAAGCGGCGTCGGCTTGAACGAATTTCTAGCTAGACA²²TATTTGCCGACTACCTTGGTGATCTCGCTTTACGCTAGT
 GGACAAATCTTCCAATGATCTGCGCGCAGGCGCAAGCGATCTTCTTGTCCAAGATAAGCCTGTCTAGCTTCAAGTATGA
 CGGGCTGATACTGGGCGGCGAGGCGCTCATTGCCAGTCGGCAGCGACATCCTTCGGCGCGATTTTGCCGGTTACTGCGCTG
 TACCAATGCGGGACAACGTAAGCACTACATTTGCTCATCGCCAGCCAGTCGGGCGGCGAGTTCCATAGCGTTAAGGTTTC
 ATTAGCGCCTCAAATAGATCCTGTTCAAGGAACCGGATCAAAGAGTTCTCCGCGCTGGACCTACCAAGGCAACGCTATGTTT
 TCTTGCTTTTGTGAGCAAGATAGCCAGATCAATGTCGATCGTGGCTGGCTCGAAGATACCTGCAAGAATGTCATTGCGCTGCCA
 TTCTCAAATGTCAGTTTCGCGCTTAGCTGGATAACGCCACGGAATGATGTCGTCGTGCACAACAATGGTGACTTCTACAGCGCG
 GAGAATCTCGCTCTCTCCAGGGGAAGCCGAAGTTTCCAAAAGGTCGTTGATCAAAGCTCGCCGCGTTGTTTCATCAAGCCTTAC
 GGTACCGTAACAGCAAATCAATATCACTGTGTGGCTTCAGGCCGCCATCCACTGCGGAGCCGTACAAATGTACGGCCAGCA
 ACGTCGGTTCGAGATGGCGCTCGATGACGCCAACTACCTCTGATAGTTGAGTCGATACTTCGGCGATCACCGCTTCCCCAT²³
 GATGTTTAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTA
 ACGCGCTTGCTGCTTGGATGCCGAGGCATAGACTGTACCCAAAAAATCATGTCATAACAAGAAGCCATGAAAACCGCCACT
 GCGCCGTTACACCGCTGCGTTCCGGTCAAGGTTCTGGACGATTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCAATTACAGCTTACGAACC
 GAACAGGCTTATGTCCACTGGGTTCTGTCGCGAATTGATCACAGGCAGCAACGCTCTGTCATCGTTACAATCAACATGCTACCC
 TCCGCGAGATCATCCGTGTTCAAACCCGGCAGCTTAGTTGCCGTTCTTCCGAATAGCATCGGTAACATGAGCAAAGTCTGCCG
 CCTTACAACGGCTCTCCGCTGACGCCGTCGCGGACTGATGGGCTGCCTGATCGAGTGGTGATTTTGTCCGAGCTGCCGT
 CGGGGAGCTGTTGGCTGGCTGG²³GGCAGGATATATTGGTGTAAAC²³AAATTGACGCTTAGACAACCTAATAACACATTGC
 GGACGTTTTTAATGTACTGAATTAACGCCGAATTGCTCTAGCATTGCGCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCG
 GTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTT
 CCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTGGCGCGCTCCCAGATTAGCCTTTTCAATTTAGAAAAGATGC
 TAACCCACAGATGGTTAGAGAGGCTTACGCAGCAGGTCTCATCAAGACGATCTACCCGAGCAATAATCTCCAGGAAATCAAAT
 ACCTTCCCAAGAAGGTTAAAGATGCAGTCAAAAGATTCAGGACTAACTGCATCAAGAACACAGAGAAAGATATATTTCTCAAG
 ATCAGAAGTACTATTCCAGTATGGACGATTCAAGGCTTGCTTCAAAACCAAGGCAAGTAATAGAGATTGGAGTCTCTAAAAA
 GGTAGTTCCCACTGAATCAAAGGCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGTAAAGACTGGCGAA

²¹ Borde derecho (RB) del T-ADN (ADN de transferencia)

²² Cassette SpeR, aminoglicosido adenililtransferasa (resistencia a espectinomicina)

²³ Borde izquierdo (LB) del T-ADN (ADN de transferencia)

CAGTTCATACAGAGTCTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCC
 AAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGG
 ATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAA
 AGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAGAA
 GAAGACGTTCCAACACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCCTA
 TCCTTCGCAAGACCCCTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGAACACGGGGGACTGTGAGATGAAAAAGCCTG
 AACTCACCGCAGCTCTGTGAGAAAGTTTCTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAA
 GAATCTCGTGCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGA
 TCGTTATGTTTATCGGCACTTTCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAGTTCAGCGAGAGCCTGA
 CCTATTGCATCTCCCGCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCGCTGTTCTTCAGCCGGTCTG
 CGGAGGTCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCA
 ATACACTACATGGCGTGATTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAAGTGTGATGGACGACACCGTCAG
 TGGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGACGCGGATT
 TCGGCTCCAACAATGTCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCACTGACTGGAGCGAGGCGATGTTCCGGGGATTCCCA
 ATACGAGGTCGCCAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATC
 CGGAGCTTGACAGATCGCCGCGGCTCCGGCGTATATGCTCCGATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGC
 AATTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTCGGGCGTACACAAA
 TCGCCCGCAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAACCGACGCCCCAGCACTCG
 TCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCGTCTAGTGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTA
 AGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAAT
 GCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAAACAAATATAGC
 GCGCAAAGTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTA²⁴GGCGCGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCAACATG
 GTGGAGCACGACACACTTGTCTTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAAC
 AAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGT
 GGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACC
 CCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAGAAAGAACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTG
 GAGCAGCAGACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAG
 GGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTC
 CTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCAC
 CCACGAGGAGCATCGTGGAAGAAAGAACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTA
 AGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGACCTCGACT
 CTAGAGGATCCCGGGTACCGGGCCCCCTCGAGGCGCGCCACCAGGTGACATGGATAAGAAGTACTCCATCGGACTGGA
 TATCGGAACTAACTCCGTGGATGGGCTGTGATCACTGATGAGTACAAGGTGCCATCCAAGAAGTTCAGGTGCTGGGAAAC
 ACTGATAGACACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCTCTGCTGTTGATTCCGGAGAGACTGCTGAGGCTACTAGACTGAA
 GAGAACTGCTAGAAGAAGATACACTAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAAGAGATCTTCTCAAACGAGATGGCTAAG
 GTGGATGATTCTTCTCCACAGACTGGAGGAGTCTTCTGGTGGAGGAGGATAAGAAGCACGAGAGACACCAATCTTCG
 GAAACATCGTGATGAGGTGGCTTACCACGAGAAGTACCAACTATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTGGATTCCACTGAT
 AAGGCTGATCTGAGACTGATCTACCTGGCTCTGGCTCACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAGGGAGATCTGAA
 CCCAGATAACTCCGATGTGGATAAGCTGTTCACTCAACTGGTGCAACTTACAACCAACTGTTGAGGAGAAACCAATCAACGC
 TTCCGGAGTGGATGCTAAGGCTATCCTGTCCGCTAGACTGTCCAAGTCCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCTCAACTGCCAG
 GAGAGAAGAAGAACGACTGTTCCGAAACCTGATCGCTCTGTCCCTGGGACTGACTCCAACTTCAAGTCCAACCTCGATCTG
 GCTGAGGATGCTAAGCTGCAACTGTCCAAGGATACTTACGATGATGATCTGGATAACCTGCTGGCTCAAATCGGAGATCAATA
 CGCTGATCTGTTCTGGCTGCTAAGAACCTGTCGATGCTATCCTGCTGTCCGATATCCTGAGAGTGAACACTGAGATCACTAA
 GGCTCCACTGTCCGCTCCATGATCAAGAGATACGATGAGCACCACCAAGATCTGACTCTGCTGAAGGCTCTGGTGAGACAA
 AACTGCCAGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTCGATCAATCCAAGAACGGATACGCTGGATACATCGATGGAGGAGCTTCCCAA
 GAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGAGAAGATGGATGGAAGTGGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAG
 GATCTGCTGAGAAAGCAAAGAAGTTCGATAACGGATCCATCCACACCAATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCTATCCTGAG
 AAGACAAGAGGATTCTACCCATTCTGAAGGATAACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACTTTTCAATCCCATACTACG
 TGGGACCACTGGCTAGAGGAAACTCCAGATTGCTTGGATGACTAGAAAGTCCGAGGAGACTATCACTCCATGGAACCTCGA

²⁴ *Cassette HygR (resistencia a higromicina)*

GGAGGTGGTGGATAAGGGAGCTTCCGCTCAATCCTTCATCGAGAGAATGACTAACTTCGATAAGAACCTGCCAAACGAGAAG
GTGCTGCCAAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACTGTGTACAACGAGCTGACTAAGGTGAAGTACGTGACTGAGGGAA
GAGAAAGCCAGCTTTCCTGTCCGGAGAGCAAAAGAAGGCTATCGTGGATCTGCTGTTCAAGACTAACAGAAAGGTGACTGTG
AAGCAACTGAAGGAGGATTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGATTCCGTGGAGATCTCCGGAGTGGAGGATAGATTCAACG
CTTCCCTGGGAACCTACCACGATCTGCTGAAGATCATCAAGGATAAGGATTTCTGGATAACGAGGAGAACGAGGATATCTG
GAGGATATCGTGTGCTGACTCTGACTCTGTTTCGAGGATAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACTTACGCTCACCTGTT
TGATAAGGTGATGAAGCAACTGAAGAGAAGAAGATACTGATGGGGAAGACTGTCCAGAAAAGCTGATCAACGGAATCAG
AGATAAGCAATCCGAAAGACTATCCTGGATTTCTGAAGTCCGATGGATTGCTAACAGAACTTCATGCAACTGATCCACG
ATGATTCCTGACTTTCAGGAGGATATCCAAAAGGCTCAAGTGTCCGGACAAGGAGATTCCCTGCACGAGCACATCGCTAAC
CTGGCTGGATCCCCAGCTATCAAGAAGGGAATCCTGCAACTGTGAAGGTGGTGGATGAGCTGGTGAAGGTGATGGGAAGA
CACAAGCCAGAGAACATCGTGATCGAGATGGCTAGAGAGAACCAACTACTCAAAGGGACAAAAGAACTCCAGAGAGAGA
ATGAAGAGAATCGAGGAGGGAATCAAGGAGCTGGGATCCCAATCCTGAAGGAGCACCCAGTGGAGAACACTCAACTGCAA
AACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAAAACGGAAGAGATATGACGTGGATCAAGAGCTGGATATCAACAGACTGTCCG
ATTACGATGTGGATCACATCGTGCCACAATCCTTCTGAAGGATGATTCCATCGATAACAAGGTGCTGACTAGATCCGATAAGA
ACAGAGGAAAGTCCGATAACGTGCCATCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAAGTACTGGAGACAAGTGTGAACGCTA
AGCTGATCACTCAAAGAAAGTTCGATAACCTGACTAAGGCTGAGAGAGGAGGACTGTCCGAGCTGGATAAGGCTGGATT
CAAGAGACAAGTGGTGGAGACTAGACAAATCACTAAGCACGTGGCTCAAATCCTGGATTCCAGAATGAACACTAAGTACGAT
GAGAACGATAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATCACTCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCAGAAAGGATTTCAATT
CTACAAGGTGAGAGAGATCAACAAGTACCACACGCTCACGATGCTTACCTGAACGCTGTGGTGGGAAGTGTCTGATCAAGA
AGTACCCAAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGAGATTACAAGGTGTACGATGTGAGAAAGATGATCGTAAGTCCGAGCA
AGAGATCGGAAAGGCTACTGCTAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACCTTCTCAAGACTGAGATCACTCTGGCTAACGG
AGAGATCAGAAAGAGACCACTGATCGAGACTAACGGAGAGACTGGAGAGATCGTGTGGGATAAGGGAAGAGATTTGCTAC
TGTGAGAAAGGTGCTGTCCATGCCACAAGTGAACATCGTGAAGAAGACTGAGGTGCAAAGTGGAGGATTTCCAAGGAGTCC
ATCCTGCCAAAGAGAAACTCCGATAAGCTGATCGCTAGAAAGAAGGATTGGGATCCAAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCCC
CAACTGTGGCTTACTCCGTGCTGGTGGTGGCTAAGGTGGAGAAGGGAAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGGAGCTGCT
GGGAATCACTATCATGGAGAGATCCTCCTTCGAGAAGAACCAATCGATTTCCTGGAGGCTAAGGGATACAAGGAGGTGAAG
AAGGATCTGATCATCAAGCTGCCAAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCTTCCGCTGGAG
AGCTGCAAAAGGGAAACGAGCTGGCTCTGCCATCCAAGTACGTGAACCTCCTGTACCTGGCTTCCACTACGAGAAGCTGAAG
GGATCCCAGAGGATAACGAGCAAAAGCAACTGTTCTGGAGCAACACAAGCACTACCTGGATGAGATCATCGAGCAAATCT
CCGAGTTCTCAAGAGAGTGATCTGGCTGATGCTAACCTGGATAAGGTGCTGTCCGCTTACAACAAGCACAGAGATAAGCCA
ATCAGAGAGCAAGCTGAGAACATCATCCACCTGTTCACTCTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCTGCTTTCAAGTACTTTCGATACT
ACTATCGATAGAAAGAGATACACTTCCACTAAGGAGGTGCTGGATGCTACTCTGATCCACCAATCCATCACTGGACTGTACGA
GACTAGAATCGATCTGTCCAACTGGGAGGAGATCTGCAACCAAGAAGAAGAGAAAGGTGGGAGGATGATCTAGACCAGA
TTAATTAAGTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGTGGAGCTCGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCT
TAAGATTGAATCCTGTTGCCGCTTTCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTA
ATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATA
GCGCGCAAAGTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTATCTATGTTACTAGATC²⁵GGGAATTCTACGCTGCCCGGGCACGCGCC
GGATCAGATTGTGTTTTCCCGCCTTCACTTACGTTTCACTGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGTAA
GACTGGCGAACAGTTCATACAGAGTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCACGACACAC
TTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATGCAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGA
AACCTCCTCGGATTCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCTACAAATGCCAT
CATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCAGGAGCA
TCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCA
CAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTTGACCAT
GGTAGATCTGAGGGTAAATTTCTAGTTTTCTCCTTCATTTTCTGGTTAGGACCTTTTCTTTTTATTTTTTGGAGCTTTGATC
TTTCTTTAACTGATCTATTTTTAATTGATTGGTTATGGTGTAATATTACATAGCTTTAACTGATAATCTGATTACTTTATTTG
TGTGTCTATGATGATGATGATAGTTACAGAACCGACGAACTAGTATGGCCTCCTCCGAGAACGTCATCACCGAGTTCATGCGCT
TCAAGGTGCGCATGGAGGGCACCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGC
CACAACACCGTGAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGG

²⁵ Cassette GmCas9 optimizado para *Glycine max* (soja)

CTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCGCCGACATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCG
TGATGAACCTTCGAGGACGGCGGCGTGGCGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCTGCTTCATCTACAAGGTGAA
GTTTCATCGGCGTGAACCTCCCTCCGACGGCCCGTGATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGCCTG
TACCCCGCGACGGCGTGTGAAGGGCGAGACCCACAAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTC
AAGTCCATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGAGCTGCCCGGCTACTACTACGTGGACGCCAAGCTGGACATCACCTCCACAA
CGAGGACTACACCATCGTGGAGCAGTACGAGCGCACCGAGGGCGGCCACCACTGTTCTGTAGCCACGTGTGAATTGGTGA
CCAGCTCGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCATGATTAT
CATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATT
AGAGTCCCAGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTC
ATCTATGTTACTAGATCGGGAATTAACATCAG²⁶TGACGCGT²⁷GTATGAACCACTTTGTACAAGAAAGCTGAACGAGAAACG
TAAAATGATATAAATATCAATATATTAATAGATTTTGCATAAAAAACAGACTACATAAATCTGTAAACACAACATATCCAGT
CACTATGGTCGACCTGCAGACTGGCTGTGTATAAGGGAGCTGACATTTATATCCCCAGAACATCAGGTTAATGGCGTTTTTG
ATGTCATTTTCGCGGTGGCTGAGATCAGCCACTTCTCCCGGATAACGAGACCGGCACACTGGCCATATCGGTGGTCATCATG
CGCCAGCTTTCATCCCGGATATGCACCACCGGGTAAAGTTCACGGGGGACTTTATCTGACAGCAGACGTGCACTGGCCAGGGG
GATCACCATCCGTCGCCCCGGGCGTGTCAATAATATCACTCTGTACATCCACAAACAGACGATAACGGCTCTCTTTTATAGGT
GTAAACCTTAACTGCATTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGACGGATCCTAACTCAAAATCCACACATTATACGAGCCG
GAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGCGGCCGCATAGTACTGGATATGTTGTGTTTTACAGTATTATGTAGTC
TGTTTTTATGCAAAATCTAATTTAATATATTGATATTTATATCATTTTACGTTTCTCGTTACGCTTTTTGTACAACTTGTGGTA
CCAGC²⁸AAAAAAAATAAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTATTTTAACTTGCTAT
TTCTAGCTCTAAAAAC²⁹TTATGCAGGTGAGTCATCACCTGCATTTCATCACTACTTCGACTCTAGCTGTATATAAACTCAGCTTC
GTTTTCTTATCTAAGCGATGTGGGACTTTTGAAGATTGTTTTCAACTTAAATGGGCCTATATAAGAAATACTATTGTTCTTTCCCA
TATAAATGGGCCTGCTTCTCTTTTTCAGATTCCAGGGGCGCTTTTGAAGATTATCTTCATATCTTAAGAATGAAGATGTTTTATT
CAATCAAATCTTGAAGTTCGATGCCTAATCATTCTAATCCTGGGACAACTATGAAACAAGATACAAAACTCCGAATGGAA
AGTAAAAAAGAAAGAAACGAAAGCTACGGTTCAAGAAAATGTAAGCTGATAACAAAAAACTGTATGAACGAAGAAGA
AGAAAAAAGCTAAGAAGAAATGATGTATTGTGCGGAAGGCAAGTCGAGTTCCGTTGTTCAACGAAAGCTTGTGGCGCGCC
GGAATCTTAATTAACAATTCGTAATCATGTATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATAC
GAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCT
TTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATTTGGAGCTT
GAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTCCGCCTTCAGTTTAACTATCAGTGT³⁰TGACAGGATATATTGGCGGGTAAAC³⁰CTAAGAG
AAAAGAGCGTTTATTAGAATAATCGGATATTTAAAGGGCGTGAAAAGGTTTATCCGTTTCGTCCATTTGTATGTGCATGC

4. Secuencia de molde de reemplazo (EPSPSTIPS-KK)

GTATTATTCTGTGAAAATGAAGCATCATGTCCCATGAAAGAAATGGACACGAAATTAAGTGGCTTATGATGTGAAATGAGGAT
AGAAATGTGTGATAGGGTTTTTAAATGGGTAGCAATAAGCATATTCAATATCTGGATTGATTGGACGTTTCTGTATAAAGGAGT
ATGCTAGCAATGTGTTAATGTATGGCTTGCTAAAATACTCCTAAAAATCAAGTGGGAGTAGTATACATATCTACAGCAAATGTA
TTAGGTGAGGCATTTGGCTTCTCTATTGTAAGGAACAAATAATATCAGTTAATGTGAAAATCAATGGTTGATTTCCAATACAT
TCATGATGTGTTATTTATATGTACCTAATATTGACTGTTGTTTTCTCCGAATGACCAAGATTATTTATTTTATCCTCTAAAGTG
ACTAATTGAGTTGCTTACTTTAGAGAAGTTGGACCCATTAGGTGAGAGCGTGGGGGAACTAATCTTGAATATACAATCTGAG
TCTTGATTATCCAAGTATGGTTGTATGAACAATGTTAGCTCTAGAAGATAAACCTCCCCAAAACACAAATTAGAATGACATTT
CAAGTTCATGTATGTCACTTTTATTCTATTATTTTACAACCTTTAGTTACTTAAACAGATGTCTTGTTCAGCATAAATTATAATTT
ATTCTGTTTTTTTTTAGGGAACAACTGTTGTAGACAACCTGTTGTATAGTGAGGATATTCATTACATGCTTGGTGCATTAAGGAC
CCTTGGACTGCGTGTGGAAGATGACAAAACAACCAACAAGCAATTGTTGAAGGCTGTGGGGGATTGTTTCCCACTAGTA^{AaG}

²⁶ *Cassette DsRED*

²⁷ *Sitio restricción MluI*

²⁸ *Cassette CcdB*

²⁹ *Cassette Scaffold SgRNA*

³⁰ *Borde derecho (RB) del T-ADN (ADN de transferencia)*

³¹AATCTAAAGATGAAATCAATTTATTCCTTGAAATGCTGGT³²ATT³³GCAATGC³⁴GTT³⁵CTTTGACAGCAGCTGTGGTTGCTGCA
 GGTGGAAATGCAAG³⁴GTCTGTTTTTTTTTTTTTTGTTGAGCATAATCTTTGAATTGTCCTCGTATAACTAATCACAACAGAGTA
 CGTGTCTTCTCTCTGTTATAATCTAAAAATCTCATCCAGATTAGTCATCCTTTCTTCTTAAAAGGAACCTTTAATTATCAATGTAT
 TTATTTAATATTTAAATTAGCTTGTCAAAGTCTAGCATATACATATTTTGATTATATTCTGAGAAATGCACCTGAGGGTGTTCCTC
 ATGATCTACTTCAACCTCTGTTATTATTAGATTTTCTATCATGATTACTGGTTTGAGTCTCTAAGTAGACCATCTTGATGTTCAAA
 ATATTTTCAGCTACGTACTTGATGGGGTGCCCCGAATGAGAGAGAGGCCAATTGGGGATTGGTTGCTGGTCTTAAGCAACTG
 GTGAGATGTTGATTGCTTCTTGGCACAACTGTCCACCTGTTCTGTAAATGGGAAGGGAGGACTTCTGGCGGAAAG³⁵GT
 ATGGTTTGATTTTCATTTAGAATAAGGTGGAGTAACTTCTGGATCAAAATTCTAATTTAAGAAGCCTCCCTGTTTTCTCTCTT
 TAGAATAAGACTAAGGGTAGGTTAGGAGTTGGGTTTTGGAGAGAAATGGAAGGGAGAGCAATTTTTTCTTCTCTAATAAAA
 TATCTTTAATTTGATACATTTTTAAGTAAAAGAATATAAAGATAGATTAGCATAACTAATGTTTAAATCTTTATTTATTTTA
 TAAATATTATATACCTGTCTATTTAAAAATCAAATATTTGTCTCCATTCCCTTTCCCTTCAAACCTCAGTTCCAAA

5. Secuencia completa del vector multipropósito PiLuCasRED_AS-TA1-EPSPS_{TIPSKK}

CAACCACAGGGTCCCCTCGGGGATCAAAGTACTTTAAAGTACTTTAAAGTACTTTAAAGTACTTTGATCCAACCCCTCCGCGGA
 GCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCG
 GAGTGTATACTGGCTTAACATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGAT
 GCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTCGGCTCGGTCGTTGCGGTGCGGCGA
 GCGGTATCAGCTCAAAAGGCGGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG
 GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAA
 AATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCG
 CTCTCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCCGGAAGCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGC
 TGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCTGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTGAGCCCGACCGCTGCGC
 CTTATCCGGTAACATCTGCTTGTAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAG
 CAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGT
 ATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGG
 TGGTTTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGA
 CGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGCATGATATATCTCCAATTTGTGTAGGGCTTATTATGCACG
 CTTAAAAATAATAAAGCAGACTTGACCTGATAGTTGGCTGTGAGCAATTATGTGCTTAGTGCATCTAATCGCTTGAGTTAAC
 GCCGGCGAAGCGGCTCGGCTTGAACGAATTTCTAGCTAGACA³⁶TATTTGCCGACTACCTTGGTGTCTGCGCTTTCACGTAGT
 GGACAAATCTTCCAAGTATCTGCGCGCAGGCCAAGCGATCTTCTTGTCCAAGATAAGCCTGTCTAGCTTCAAGTATGA
 CGGGCTGATACTGGGCGGCGAGGCGCTCCATTGCCAGTCGGCAGCGACATCCTTCGGCGCGATTTGCCGGTACTGCGCTG
 TACCAATGCGGGACAACGTAAGCACTACATTTGCTCATCGCCAGCCAGTCGGGCGGCGAGTTCCATAGCGTTAAGGTTTC
 ATTTAGCGCCTCAAATAGATCCTGTTAGGAACCGGATCAAAGAGTTCCTCCGCGCTGGACCTACCAAGGCAACGCTATGTTT
 TCTTGCTTTTGTGAGCAAGATAGCCAGATCAATGTCGATCGTGGCTGGCTCGAAGATACCTGCAAGAATGTCATTGCGCTGCCA
 TTCTCAAATGTCAGTTGCGCTTAGCTGGATAACGCCACGAATGATGTCGTCGTGCACAACAATGGTGACTTCTACAGCGCG
 GAGAATCTCGCTCTCTCCAGGGGAAGCCGAAGTTTCAAAAAGGTCGTTGATCAAAGCTCGCCGCGTTGTTTCATCAAGCCTTAC
 GGTACCGTAACAGCAAATCAATATCACTGTGTGGCTTCAAGGCCCATCCACTGCGGAGCCGTACAAATGTACGGCCAGCA
 ACGTCGGTTCGAGATGGCGCTCGATGACGCCAACTACCTCTGATAGTTGAGTCGATACTTCGGCGATCACCGCTTCCCCCAT³⁶G
 ATGTTTAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACATCGACCCACGGCGTAAC
 GCGCTTGTGCTTGGATGCCGAGGCATAGACTGTACCCAAAAAATCATGTCATAACAAGAAGCCATGAAAACCGCCACTGC
 GCCGTTACACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGA_gGCATACGCTACTTGCAATTACAGCTTACGAACCGA
 ACAGGCTTATGTCCACTGGGTTCTGCGCCGAATTGATCACAGGCAGCAACGCTCTGTATCGTTACAATCAACATGCTACCTC
 CGCGAGATCATCCGTGTTTCAAACCCGGCAGCTTAGTTGCCGTTCTCCGAATAGCATCGGTAACATGAGCAAAGTCTGCCGCC

³¹ Mutación silenciosa lisina-lisina (K-K) en PAM asociado a TA1

³² Mutación Thr102-Ile (TI)

³³ Mutación Pro106-Ser (PS)

³⁴ Exón 2 del gen *EPSPS1* de soja

³⁵ Exón 3 del gen *EPSPS1* de soja

³⁶ *Cassette* SpeR, aminoglicosido adenililtransferasa (resistencia a espectinomicina)

TTACAACGGCTCTCCCGCTGACGCCGTCCGGACTGATGGGCTGCCTGTATCGAGTGGTGATTTTGTGCCGAGCTGCCGGTCTG
 GGGAGCTGTTGGCTGGCTGG³⁷GGCAGGATATATTGGTGTAAAC³⁸AAATTGACGCTTAGACAACCTAATAACACATTGCGG
 ACGTTTTTAATGTACTGAATTAACGCCGAATTGCTCTAGCATTGCCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTG
 CGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGTAACGCCAGGGTTTTCCC
 AGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTGGCGCGCTCCCAGATTAGCCTTTTCAATTTAGAAAAGATGCTAA
 CCCACAGATGGTTAGAGAGGCTTACGCAGCAGGTCTCATCAAGACGATCTACCCGAGCAATAATCTCCAGGAAATCAAATACC
 TTCCAAGAAGGTTAAAGATGCAGTCAAAAGATTGAGGCTAACTGCATCAAGAACACAGAGAAAGATATATTTCTCAAGATC
 AGAAGTACTATTCCAGTATGGACGATTCAAGGCTTGCTTCACAAACCAAGGCAAGTAATAGAGATTGGAGTCTCTAAAAAGGT
 AGTTCCCACTGAATCAAAGGCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGTAAAGACTGGCGAACAG
 TTCATACAGAGTCTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTCGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAA
 AATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAAT³⁸TGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATT
 CCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAG
 GAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACACGAGGAGCATCGTGAAAAAGA
 AGACGTTCCAACACGCTCTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCC
 TTCGCAAGACCCCTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGAACACGGGGGACTGTCGAGATGAAAAAGCCTGAAC
 TCACCGCAGCTGTGCGAGAAGTTCTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAA
 TCTCGTGCTTTAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCG
 TTATGTTTATCGGCACTTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAGTTGAGCGAGAGCCTGACCTA
 TTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTTCAGCCGGTTCGCGG
 AGGTCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATA
 CACTACATGGCGTGATTTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACTGTGATGGACGACACCGTCAGTGC
 GTCCGTGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTTCG
 GCTCCAACAATGCTCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCAATTGACTGGAGCGAGGCGATGTTGCGGGATTCCAATA
 CGAGGTGCGCAACATCTTCTTCTGAGGGCGTGGTTGGCTTGATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCG
 GAGCTTGACAGATCGCCGCGGCTCCGGGCGTATATGCTCCGATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGTTGACGGCAA
 TTTGATGATGAGCTTGGGCGCAGGGTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTCGGGCGTACACAAATC
 GCCCGCAGAAGCGCGGCCGTCTGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAACCGACGCCCCAGCACTCGTC
 CGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCGTCTAGTGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAG
 ATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGC
 ATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGC
 GCAAACCTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTA³⁸GGCGCGCCAAGCTTGATGCCTGCAGGTCAACATGGT
 GGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAA
 GGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAAAGGAAGGTGGC
 TCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCC
 ACCCAGGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACACGCTCTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAG
 CACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGT
 AATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAAAGGAAGGTGGCTCCTA
 CAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCA
 CGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACACGCTCTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCACTGACGTAAG
 GGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGACCTCGACTCTA
 GAGGATCCCCGGGTACCGGGCCCCCTCGAGGCGCGCCACCAGTTCGACATGGATAAGAAGTACTCCATCGGACTGGATAT
 CGGAATAACTCCGTGGGATGGGCTGTGATCACTGATGAGTACAAGGTGCCATCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGAAACACT
 GATAGACACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCTCTGCTGTTGATTCCGGAGAGACTGCTGAGGCTACTAGACTGAAGA
 GAACTGCTAGAAGAAGATACACTAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAAGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCTAAGGT
 GGATGATTCTTCTTCCACAGACTGGAGGAGTCTTCTGGTGGAGGAGGATAAGAAGCACGAGAGACACCCAATCTTCGGA
 AACATCGTGGATGAGGTGGCTTACCACGAGAAGTACCAACTATCTACCCTGAGAAAGAAGCTGGTGGATTCCACTGATAA
 GGCTGATCTGAGACTGATCTACCTGGCTCTGGCTCACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAGGGAGATCTGAACC
 CAGATAACTCCGATGTGGATAAGCTGTTCACTCAACTGGTGCAACTTACAACCAACTGTTGAGGAGAACCCAATCAACGCTT

37 Borde izquierdo (LB) del T-ADN (ADN de transferencia)

38 Cassette HygR (resistencia a higromicina)

CCGGAGTGGATGCTAAGGCTATCCTGTCCGCTAGACTGTCCAAGTCCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCTCAACTGCCAGGA
GAGAAGAAGAACGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCTCTGTCCCTGGGACTGACTCCAACTTCAAGTCCAACTTCGATCTGGC
TGAGGATGCTAAGCTGCAACTGTCCAAGGATACTTACGATGATGATCTGGATAACCTGCTGGCTCAAATCGGAGATCAATACG
CTGATCTGTTCTGGCTGCTAAGAACCTGTCCGATGCTATCCTGCTGTCCGATATCCTGAGAGTGAACACTGAGATCACTAAGG
CTCCACTGTCCGCTTCCATGATCAAGAGATACGATGAGCACCACCAAGATCTGACTCTGCTGAAGGCTCTGGTGAGACAACAA
CTGCCAGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGATCAATCCAAGAACGGATACGCTGGATAACATCGATGGAGGAGCTTCCCAAGA
GGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGAGAAGATGGATGGAAGTGGAGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGGA
TCTGCTGAGAAAGCAAAGAACTTTCGATAACGGATCCATCCACACCAAATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCTATCCTGAGAA
GACAAGAGGATTTCTACCCATTCTGAAGGATAACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACTTTCAGAATCCATACTACGTG
GGACCACTGGCTAGAGGAACTCCAGATTGCTTGGATGACTAGAAAAGTCCGAGGAGACTATCACTCCATGGAATTCGAGG
AGGTGGTGGATAAGGGAGCTTCCGCTCAATCCTTCATCGAGAGAATGACTAACTTCGATAAGAACCTGCCAAACGAGAAGGT
GCTGCCAAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACTGTGTACAACGAGCTGACTAAGGTGAAGTACGTGACTGAGGGAATGA
GAAAGCCAGCTTCTGTCCGAGAGCAAAAGAAGGCTATCGTGGATCTGCTGTTCAAGACTAACAGAAAGGTGACTGTGAA
GCAACTGAAGGAGGATTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGATTCCGTGGAGATCTCCGAGTGGAGGATAGATTCAACGCT
TCCCTGGGAACCTACCACGATCTGCTGAAGATCATCAAGGATAAGGATTTCTGGATAACGAGGAGAACGAGGATATCCTGGA
GGATATCGTGTGCTGACTCTGACTCTGTTTCGAGGATAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACTTACGCTCACCTGTTTCGATG
ATAAGGTGATGAAGCAACTGAAGAGAAGAAGATACACTGGATGGGGAAGACTGTCCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAG
ATAAGCAATCCGAAAGACTATCCTGGATTTCTGAAAGTCCGATGGATTCGCTAACAGAACTTCATGCAACTGATCCACGATG
ATTCCTGACTTTCAGGAGGATATCCAAAAGGCTCAAGTGTCCGACAAGGAGATTCCCTGCACGAGCACATCGCTAACCTG
GCTGGATCCCCAGCTATCAAGAAGGGAATCCTGCAAAGTGTGAAGGTGGTGGATGAGCTGGTGAAGGTGATGGGAAGACAC
AAGCCAGAGAACATCGTGATCGAGATGGCTAGAGAGAACCAAAGTACTCAAAAAGGACAAAAGAAGTCCAGAGAGAGAATG
AAGAGAATCGAGGAGGGAATCAAGGAGCTGGGATCCCAAATCCTGAAGGAGCACCCAGTGGAGAAGCACTCAACTGCAAAAC
GAGAAGCTGTACTGTACTACTGCAAAACGGAAGAGATATGTACGTGGATCAAGAGCTGGATATCAACAGACTGTCCGATTA
CGATGTGGATCACATCGTGCCACAATCCTTCCTGAAGGATGATTCCATCGATAACAAGGTGCTGACTAGATCCGATAAGAACA
GAGGAAAGTCCGATAACGTGCCATCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAAGTACTGGAGACAAGTCTGAACGCTAAGC
TGATCACTCAAAGAAAGTTCGATAACCTGACTAAGGCTGAGAGAGGAGGACTGTCCGAGCTGGATAAGGCTGGATTCATCAA
GAGACAAGTGGTGGAGACTAGACAAATCACTAAGCACGTGGCTCAAATCCTGGATTCCAGAATGAACACTAAGTACGATGAG
AACGATAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATCACTCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTAGAAAAGGATTTCAATTCTA
CAAGGTGAGAGAGATCAACAAGTACCACCACGCTCACGATGCTTACCTGAACGCTGTGGTGGGAAGTCTGCTGATCAAGAAGT
ACCCAAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGAGATTACAAGGTGTACGATGTGAGAAAGATGATCGCTAAGTCCGAGCAAGA
GATCGGAAAGGCTACTGCTAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACCTTCTCAAGACTGAGATCACTCTGGCTAACGGAGA
GATCAGAAAGAGACCACTGATCGAGACTAACGGAGAGACTGGAGAGATCGTGTGGGATAAGGGAAGAGATTTCGCTACTGT
GAGAAAGGTGCTGTCCATGCCACAAGTGAACATCGTGAAGAAGACTGAGGTGCAAAGTGGAGGATTCTCAAGGAGTCCATC
CTGCCAAAGAGAAAAGTCCGATAAGCTGATCGCTAGAAAAGAAGGATTGGGATCCAAAGAAGTACGGAGGATTTCGATCCCCAA
CTGTGGCTTACTCCGTGCTGGTGGTGGCTAAGGTGGAGAAGGGAAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGGAGCTGCTGG
GAATCACTATCATGGAGAGATCCTCCTTCGAGAAGAACCAATCGATTTCCTGGAGGCTAAGGGATACAAGGAGGTGAAGAA
GGATCTGATCATCAAGCTGCCAAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCTTCCGCTGGAGAG
CTGCAAAAGGGAAACGAGCTGGCTCTGCCATCCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGCTTCCCACTACGAGAAAGCTGAAGGG
ATCCCAGAGGATAACGAGCAAAAGCAACTGTTCTGGAGCAACACAAGCACTACCTGGATGAGATCATCGAGCAAACTCC
GAGTTCTCAAGAGAGTATCCTGGCTGATGCTAACCTGGATAAGGTGCTGTCCGCTTACAACAAGCACAGAGATAAGCCAAT
CAGAGAGCAAGCTGAGAATCATCCACCTGTTCACTCTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCTGCTTCAAGTACTTCGATACTAC
TATCGATAGAAAGAGATACACTTCCACTAAGGAGGTGCTGGATGCTACTCTGATCCACCAATCCATCACTGGACTGTACGAGA
CTAGAATCGATCTGTCCCAACTGGGAGGAGATCTGCAACCAAGAAGAAGAGAAAGGTGGGAGGATGATCTAGACCAGATTA
ATTAAGTATGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAA
GATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTTCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATG
CATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCG
CGCAAAGTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATC³⁹GGGAATTCTACGCTGCCCCGGGCACGCGCCGGA
TCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTAGCTTCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGTAAAGAC
TGGCGAACAGTTCATACAGAGTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCACATGGTGGAGCACGACACACTTG

³⁹ *Cassette GmCas9 optimizado para Glycine max (soja)*

TCTACTCCAAAAATATCAAAGATGCAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAAC
CTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCAT
TGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGACCCACCCACGAGGAGCATCG
TGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAA
TCCCCTATCCTTCGCAAGACCCCTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTTGACCATGGT
AGATCTGAGGGTAAATTTCTAGTTTTCTCCTTCATTTCTTGGTTAGGACCCCTTTCTCTTTTATTTTTTGAGCTTTGATCTTTC
TTTAAACTGATCTATTTTAAATTGATTGGTTATGGTGAAATATTACATAGCTTTAACTGATAATCTGATTACTTTATTTCTGTGT
GTCTATGATGATGATGATAGTTACAGAACCACGAACTAGTATGGCCTCCTCCGAGAACGTCATACCGAGTTCATGCGCTTCA
AGGTGCGCATGGAGGGCACCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCCAC
AACACCGTGAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCAGTACGGCTC
CAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGT
ATGAACCTCGAGGACGGCGCGCTGGCGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCTGCTTCATCTACAAGGTGAAGT
TCATCGGCGTGAACCTCCCTCCGACGGCCCGTGATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGCTGT
CCCCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGACCCACAAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAA
GTCCATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGAGCTGCCCGCTACTACTAGTGGACGCCAAGCTGGACATCACCTCCACAACG
AGGACTACACCATCGTGAGCAGTACGAGCGCACCGAGGGCGGCCACCCTGTTCTGTAGCCACGTGTGAATTGGTGACC
AGCTCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCATGATTATCA
TATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAG
AGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCAT
CTATGTTACTAGATCGGGAATTAACCTATCAG⁴⁰TGACGCGT⁴¹GGGATTGTTCCCACTAGTAAGG⁴²GTATTATTCTGTGAAAA
TGAAGCATCATGTCCCATGAAAGAAATGGACACGAAATTAAGTGGCTTATGATGTGAAATGAGGATAGAAATGTGTGATAGG
TTTTTAATGGGTAGCAATAAGCATATTCAATATCTGGATTGATTGGACGTTTCTGTATAAAGGAGTATGCTAGCAATGTGTTA
ATGTATGGCTTGCTAAAATACTCCTAAAAATCAAGTGGGAGTAGTATACATATCTACAGCAATGTATTAGGTGAGGCATTTG
GCTTCTCTATTGTAAGGAACAAATAATATCAGTTAATGTAAAAATCAATGGTTGATTTCCAATACATTATGATGTGTTATTTA
TATGTACCTAATATTGACTGTTGTTTTCTCCGCAATGACCAAGATTATTTATTTATCTCTAAAGTGACTAATTGAGTTGCTTA
CTTTAGAGAAGTTGGACCCATTAGGTGAGAGCGTGGGGGAACTAATCTGAATATACAATCTGAGTCTTGATTATCCAAGTA
TGGTTGTATGAACAATGTTAGCTCTAGAAGATAAACCTCCCCAAAAACAAATTAGAATGACATTTCAAGTTCATGTATGT
CACTTTCATTCTATTATTTTACAACTTTTAGTTACTTAACAGATGTCTTGTTACAGCATAAATTATAATTTATTCTGTTTTTTTTAG
GGAACAACCTGTTGTAGACAACCTGTTGTATAGTGAGGATATTCATTACATGCTTGGTGCATTAAGGACCTTGACTGCGTGTG
GAAGATGACAAAAACCAACCAAGCAATTGTTGAAGGCTGTGGGGGATTGTTCCCACTAGTA⁴³AAG⁴⁴AATCTAAAGATGAA
ATCAATTTATTCCTTGAAATGCTGGT⁴⁵GCAATGC⁴⁶GTT⁴⁷CCTTGACAGCAGCTGTGGTTGCTGCAGGTGGAAATGCAAG⁴⁸
GTCTGTTTTTTTTTTTTTTGTTGAGCATAATCTTTGAATTGTTCTCGTATAACTAATCACAACAGAGTACGTGTTCTTCTCCTGT
TATAATCTAAAAATCTCATCCAGATTAGTCATCCTTTCTTCTTAAAGGAACCTTAATTATCAATGTATTTATTTAATATTTAAAT
TAGCTTGTCAAAGTCTAGCATATACATATTTGATTATATTCTGAGAAATGCACCTGAGGGTGTTCCTCATGATCTACTTCAACC
TCTGTTATTATTAGATTTTCTATCATGATTACTGGTTGAGTCTCTAAGTAGACCATCTTGATGTTCAAAATATTTTCAAGTACGTA
CTTGATGGGGTGCCCCGAATGAGAGAGAGGCCAATTGGGGATTGGTTGCTGGTCTTAAGCAACTTGGTGCAGATGTTGATT
GCTTCTTGGCACAACCTGTCCACCTGTTCTGTGAAATGGGAAGGGAGGACTTCTGGCGGAAAG⁴⁹GTATGGTTTGGATTTC
TTAGAATAAGGTGGAGTAACCTTCTGGATCAAAATCTAATTTAAGAAGCCTCCCTGTTTCTCTCTTTAGAATAAGACTAA
GGGTAGGTTTAGGAGTTGGGTTTTGGAGAGAAATGGAAGGGAGAGCAATTTTTTCTTCTCTAATAAATATTCTTTAATTTGA
TACATTTTTTAAGTAAAGAATATAAAGATAGATTAGCATAACTAATGTTTTAATCTTTATTTATTTTATAAATATTATATACC
TGTCTATTTAAAAATCAAATATTTGTCTCCATTCCCTTTCCCTTCAAAACCTCAGTTCCAAA⁵⁰GGGATTGTTTCCCACTAGTAAGG

⁴⁰ *Cassette DsRED*

⁴¹ *Sitio de restricción MluI*

⁴² *Secuencia TA1+PAM*

⁴³ *Mutación silenciosa lisina-lisina (K-K) en PAM asociado a TA1*

⁴⁴ *Mutación Thr102-Ile (TI)*

⁴⁵ *Mutación Pro106-Ser (PS)*

⁴⁶ *Exón 2 del gen EPSPS1 de soja*

⁴⁷ *Exón 3 del gen EPSPS1 de soja*

⁴⁸AAAAAAAAA TAAAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTA
 GCTCTAAAC⁴⁹TACTAGTGGGAAACAATCCC⁵⁰TTATGCAGGTGAGTCATCACCTGCATTTCAATCACTACTTCGACTCTAGCTG
 TATATAAACTCAGCTTCGTTTTCTTATCTAAGCGATGTGGGACTTTTGAAGATTGTTTCAACTTAAATGGGCCTATATAAGAAA
 TACTATTGTTCTTTCCCATATAAATGGGCCTGCTTCTCTTCTTTCAGATTCCCAGGGGCTTTTGAAGATTATCTTCATATCTTAA
 GAATGAAGATGTTTTATTCAATCAAATCTTGAAGGTTTCGATGCCTAATCATTCTAATCCTGGGACAACTATGAAACAAGATA
 CAAAACTCCGAATGGAAAGTTAAAAAGAAGAAAACGAAAGCTACGGTTCAAGAAAATGTAAGCTGATAAACAACAAAAA
 TGTATGAACGAAGAAGAAGAAAAAAGCTAAGAAGAAATGATGTATTGTGCGGAAGGCAAGTCGAGTTTCCGTTGTTCAACG
 AAAGCTTGTGGCGCGCCGAATTCTTAATTAACAATTCGTAATCATGTATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC
 AATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGT
 TGGCTCACTGCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGG
 TTTGCGTATTGGAGCTTGAGCTTGATCAGATTGTCGTTCCGCTTCAGTTAACTATCAGTGT⁵¹TGACAGGATATATTGGC
 GGGTAAAC⁵²CTAAGAGAAAAGAGCGTTATTAGAATAATCGGATATTTAAAGGGCGTGAAAAGGTTTATCCGTTCTGCCATT
 TGTATGTGCATGC

6. Secuencia genómica del gen *EPSPS1* (Glyma.01G139600) de *Glycine max* y con respectivos primers utilizados para genotipado

>Glyma.01G139600|Chr01:46734394..46743155 reverse

TAAGCAATTCGACATGTGTTAGTGTAGTTGGCAACCAAAAATCCCTTTATGTGACTCAATCCAACAACCACTCACACCACCAAC
 CCCATAACCATTTCTCACAATACCCTTCATTACACATTATCATCACCAAAAATAAATAAAAAAAACCTCTCATTTCAGAGAGA
 GAGAGAGAGACTTCACAGACCAAAAGTGCAGAGAACAACAAAGTTCACAACCTTAAGGAAAATTGAAATGGCCCAAGTGAGCA
 GAGTGCACAATCTTGCTCAAAGCACTCAAATTTTTGGCCATTCTTCCAA⁵³CTCCAACAACTCAAATCGG⁵²TGAATTCGGTTTCAT
 TGAGGCCACGCCTTTGGGGGGCTCAAATCTCGCATCCCGATGCATAAAAAATGGAAGCTTTATGGGAAATTTTAAATGTGGGG
 AAGGGAAATTCGGCGTGTTTAAAGGTTTCTGCATCGGTGCGCGCCGAGAGAAGCCGTCACGTCGCGGAGATCGTGTGG
 AACCCATCAAAGACTTCTCGGGTACCATCACATTGCCAGGGTCCAAGTCTCTGTCCAATCGAATTTTGCTTCTTGCTGCTCTCTC
 TGAGGTGAAGTTATTTATTTATTTATTTGTTT⁵⁴GTGTTGGGTGTGGGAATAG⁵³GAGTTTGATGTGTAGAGTGGAATTTG
 AATATTTGATTTTTTTT⁵⁵GTATTATTCTGTGAAAATGAAGC⁵⁴ATCATGTCCCATGAAAGAAATGGACACGAAATTAAGTGGCTT
 ATGATGTGAAATGAGGATAGAAATGTGTGTAGGGTTTTTAAATGGGTAGCAATAAGCATATTCAATATCTGGATTGATTTGGA
 CGTTTCTGTATAAAGGAGTATGCTAGCAATGTGTTAATGTATGGCTTGCTAAATACTCCTAAAAATCAAGTGGGAGTAGTATA
 CATATCTACAGCAAATGTATTAGGTGAGGCATTTGGCTTCTCTATTGTAAGGAACAAATAATATCAGTTAATGTGAAAATCAAT
 GGTTGATATTCCAATACATTCATGATGTGTTATTTATATGTACCTAATATTGACTGTTGTTTTTCTCCGCAATGACCAAGATTATT
 TATTTATCCTCTAAAGTGACTAATTGAGTTGCTTACTTTAGAGAAGTTGGACCCATTAGGTGAGAGCGTGGGGGGAACATAATC
 TTGAATATACAATCTGAGTCTTGATTATCCAAGTATGGTTGTATGAACAATGTTAGCTCTAGAAGATAAACCCCTCCCCAAAAA
 ACAAATTAGAATGACATTTCAAG⁵⁵TTCCATGTATGTCACCTTCATTCTATTATTTTACAACCTTTAGTTACTTAACAGATGTCTT
 GTTCAGCATAAATTATAATTTATTTCTGTTTTTTTAGGGAACAACCTGTTGTAGACAACCTGTTGTATAGTGAGGATATTCATTAC
 ATGCTTGGTGCATTAAGGACCTTGGACTGCGTGTGGAAGATGACAAAACAACCAACAAGCAATTGTTGAAGGCTGTGGGG
 GATTGTTTCCCACTAGTAAGGAATCTAAAGATGAAATCAATTTATCCTTGGAATGCTGGTACTGCAATGCGTCCTTTGACAG
 CAGCTGTGGTTGCTGCAGGTGGAATGCAAGGTCTGTTTTTTTTTTTTTTGTTTCAGCATAATCTTTGAATTGTTCTCGTATAACT
 AATCACAAACAGAGTACGTGTTCTTCTCTGTTATAATCTAAAAATCTCATCCAGATTAGTCATCCTTTCTTCTTAAAGGAACCT
 TTAATTATCAATGTATTTATTTAATATTTAAATTAGCTTGTCAAAGCTAGCATATACATATTTTGATTATATTCTGAGAAATGCA
 CCTGAGGGTGTTCCTCATGATCTACTCAACCTCTGTTATTATTAGATTTTCTATCATGATTACTGTTTGAGTCTCTAAGTAGAC

⁴⁸ Secuencia TA1+PAM

⁴⁹ *Cassette Scaffold sgRNA*

⁵⁰ Adaptador T1 (*SgRNA-1*)

⁵¹ Borde derecho (RB) del T-ADN (ADN de transferencia)

⁵² FwEPSPS_ Ex1 CTCCAACAACTCAAATCGG

⁵³ FwEPSPS_ IN GTTGTGGGTGTGGGAATAG

⁵⁴ FwEPSPSintronic GTATTATTCTGTGAAAATGAAGC

⁵⁵ FwEPSPS1 genom int CACAAATTAGAATGACATTTCAAG

CATCTTGATGTTCAAATATTTTCAGCTACGTACTTGATGGGGTGCCCCGAATGAGAGAGAGGCCAATTGGGGATTGGTTGCT
 GGTCTTAAGCAACTTGGTGCAGATGTTGATTGCTTTCTTGGCACAACCTGTCCACCTGTTCTGTAAATGGGAAGGGAGGACT
 TCCTGGCGGAAAGGTATGGTTTGGATTTCATTTAGAATAAGGTGGAGTAACCTTCTGGATCAAAATCTAATTTAAGAAGCCT
 CCCTGTTTTCTCTCTTTAGAATAAGACTAAGGGTAGGTTTAGGAGTTGGGTTTTGGAGAGAAATGGAAGGGAGAGCAATTTT
 TTTCTTCTTAATAAATATTTCTTAATTTGATACATTTTTAAGTAAAAGAATATAAAGATAGATTAGCATAACTTAATGTTTTA
 ATCTTTTATTTATTTTATAAATATTATATACCTGTCTATTTAAAAATCAAATATTTGCTCTCCATTCCCTTTCCCTTCAAAACCTCA
 GTTCCAAA⁵⁶TATACCGTAGTTGAATTATATTTTGAAGGCCTATTGGTTGGAGACTTTTCTTTTCAGAGATTATCCCTCACCTTT
 ATTATAGCCTTTCTATTTTTAACTTCATATAGACGCCATTCTGTTTTAAAAAACACTAAGTTTTCTTTAGTTATACCTTCCCT
 CCTATTCTCTCAAAGTAAATATTGTAGCAAG⁵⁷TGTTGGTTGATCCATTGTGAATCTTATTATCCTATTTAACATGCAAGTGAA
 ACTGTCTGGATCAG⁵⁸TTAGCAGTCAATACTTGACTGCTTTGCTTATGGCAGCTCCTTAGCTCTGGTGATGTGGAAATTGAGA
 TTGTTGATAAACTGATTTCTGTTCCATATGTTGAAATGACTCTGAAGTTGATGGAGCGTTTTGGAGTTCTGTGGAACACAGTG
 GTAATTGGGATAGGTTCTGGTCCATGGAGGTCAAAGTACAAGTAGGTTTCTATGTTTTAGTGTTACATCACTTTTAGTATCC
 AAAATGCAATGAAATTAACCTCATGTTTCTATTAGGTCTCTGGCAATGCTTTTGTGAAGGTGATGCTTCAAGTGCCAGTTA
 TTTACTAGCTGGTGCAGCAATTACTGGTGGGACTATCACTGTTAATGGCTGTGGCACAAGCAGTTTACAGGTATTCATGAATGA
 CACTATCTTCTATTATCTTTTATTTATAGCTTACACTATCATTCTAATTCAACCCCTTCTTTCTCTTCCCCTCACTCCCAAAT
 AGAGCTTATCATTGTATCCTTAATAGCTCTTTTATGTGCTGTTTCATCTCTTGAGCAGATTCTACATGATTATCCTTTTATGTA
 CTTTTTGTCTTTTAAATAATTGATATCATTTGAACCTGCACATCATCTCTATCCTTCTCATTTTATTATTTTATTAAGAGT
 GATAAAATTACATTGTCAAGTAAAGCAAGTTAGCGTATCAGATAATGATGCTTCGATTGCAGAATTGGTGAAAGCTTGACAAA
 TTCATTAGCTTAGTGACAATTGTGATGTAGATAGCCATAATCTCCATGCAACTTATTATGCTTTTTGTCTAAACTCTTTTGCA
 CTTAAACATGAATTAGAGAGTTAGGATGAACAATAGTAACAGACACAAAGCTTATTTCTAGACCACCCAGTGGTGAAGACGAA
 GCAGCATGAGTGAGATTAATGGCAGCATCTGATTGAAGCTTCTTTGGTATTATTGGAGATGAAATCTTGAGCCAAATTAGGG
 CTTTTGCCTCTCAATAGCCATTGGTTCAAATGCTTTCAATAAAATGATTACAGAATCAAATCTTAAGAAAGACCTTCAAGA
 ACAACATCAAGATGTTTCTGTGCAAAACAGGCTCACCTACAAAAGAGTGCTACAAGCACCTTACACTTGCAAAAAATCCT
 TAACTGAACAATTGCCAAGAGTCATGTTGCAAACTTGAGATTGGAGTTGATTAGATTGGTGTGTGTGAGATTCTGGAATGA
 GCATGAAGTTTTTGCAAAGCTCATAAATGAATGCAGCCAAGAATCCTAGATAGGATTGAATTTGAGAGAGAGGCTTGAAGT
 CAAGATAACCGCAACTGATCTTGCTGTTCCCATGCTGCATAGGACTCGTTGATTCTACCAAGATAACAATCTTCTGTGGTGAGA
 ATATGAGTGGGAATTGTGAGGCAACAAAGAAAATGAAGGCTATGAGCCTTTGTTAAGGTGCAGAGAGAAAACAGAAAATGA
 AGAAGCTGTGTATTGAAGGAATTGAAAAGCCAATTACAATTGTGTTGCAGAGAGATATTTATAGTTCTGAAGTGTATAACTAAC
 TAAACAGAATGCTACCAACCTAGAGGCAGTTGAGAATTGCTCCCTATTACAATACTCTCACAGCCTTGATGATAGGCTTGATT
 TGCTGCCACCGAAGAAGAACATTATTGTTGGAGAGTTTTTCACTGATTGCATCAGAGAAAGTTACAAGTGTGATTGGAGATGA
 AGGACTTGCGGTGCTCGAAGGTTAAGTGTAAAGTGGTGAATGTGTATCGGAGGTGGTTGCCTAGCCCAAGAAGCTGGTTGC
 AGTGGAAAGCGGATGCGGCAGAAGCCATGGGTTGAGATCAGAACTATGTTCTAGATACCATATTAGGGTTAGCTTTCAAGAGA
 AAACCTTATGAACTGAACTGAACTGTTGTATTATTGATTAGCTGATCTAGTAGTGATGGAAGCTTGCTTGCAGAGCTTCTAT
 GGAGGCTGGATCATTGAGCTTCAATGAGGTCTTCAATGGTGATTTTTACCATGGAGATGCAGCGGAAGATAAATGAAGAG
 GTGAGAGGAGGCGTCATCCACTAGGAAATAAACTATGGAAGAAGGAGCTTACCACCAAGAGAGTGTCTTGATAAGAAGCT
 TAGAGAGGAAGCTTCAATGGAGGAATAGAAAGAGAGAGGGGGAACAAAAAATTGAAGGAGGAAAAGAGGGAGAGAAGTT
 GAACCTTGAAGTGTGTCTACAAGACTCATTCAATAAAGTTACAACAAGTGTTACACATGCTTCTATTTATAGTCTAGGTAACCT
 CCTTGAGAAGCTAGAAGCTTAACTACACACACCTCTCTAATAACTAAGATAACCTCCTTGAGAAATTTCTTGAGAAGCTTCTTA
 AGAAGATTCTAGAGAAGCTAAAGCTTAGTTACACACACCTCTCTAATAACTAAGTTCACCTCCTTGAGATGAGAAGCTAGAGC
 CTTAGCTACACACACCTTATAATAGCTAACTCACTCTATTCCAAAATACATGAAAATACAAAAAAGTTCCTACTACAAAGATT
 ACTCAAAATGTCCTGAAATACAAGACTAAAACCTATACTACTAGAATGGTCAAAATACAAGGTCCAAAAGAAGGAAAAACCT
 ATTCTAATATTTACAAAGAGAGTGGACCCAACCTTAGTCCATGGGCTCAGAAATCTACCCTGAGGTTCATGGGAATCCTAGGGT
 CTCTTTAGTAGCTCTAGTCCAATTTTCTTGAGTCTTCTATCCAATATCCTTGGGGGTAGGATTGCATCATGTAGTACAAGAGA
 GGGGAATATATACAGTTGTAAGTTGTAACCTAATCAAACCAACTGACTCACCATACACAGAAAAACAATGTACAAAG
 GATAATAGAAAACTGAACTGAGATATACTCATTACATAGAAGAATTACATGATGAATCTGAAAATTTAATTGGGAAACTG
 AGGACAATAACAAGGCTTTCAGAGTTCATTTGACAATAGGTAAATATGGACTTCACTTAGACCTCAAGGTATGCTTGGG
 AGTGGGGTTTTAGAGGAAAAGGGGAAGGAGGGAATTTTTAATTCTAGTAAATATTCTATTTTGATTAAATTTTAAATAA

⁵⁶ RvEPS_{PS}intronic TTTGGAAGTGGGTTTGAAGGG

⁵⁷ RvEPS_{PS}_IN CTTGCTACAATATTACTTTGGAGAG

⁵⁸ RvEPS_{PS}_Ex4 CTGATCCAGACAGTTTCACC

AACAAATAAACTTATAGATTAGCATTCACTTAATGTCCTGATCTTTATTTGTTTCATGAAGTTTTTATAGCCTTTCTGTTTCTGT
TAAAAGAAAATTGGAGGGTGTTCAATCTATATGCCCATATATATGTATTGTCCTGTTGTCTGTGTTTCTGTTTCTTTCTTTAGT
GTCTCGCCTTTCCTTAATTCCTTATCAACACCTTGTTTATTTTAAAACTTAAATGTCCTCATTTTTTTTACCTGTACTATAACTTT
CCAAACAAATAGTAGAAAATGTTTCAAATATCCCCAGAAGTGTTCAGTGAACAAAGTTCAAGCCAGAAAAAAGCAAGCAG
AGGCTAAAGAAGTATATCTTATTGTGAAGAGTAATCTCAATTGGTTAATTATCGAATTGTATCATTTTACAATAGAAAATTAGA
AGTGGGTTGATTAGTTTATACGAACAATTATTTAAATAGGGTTGATGGTGTGGTTAATTACTGATCATATGTTAAGACTATGAG
TCGATGACCAGCCTCAGTGCAGTCATTTAAGTTCATTATTTTTTAATTGTGCTTATGTTTAACTTTGTCCTTCTTTTAAAGGGA
GATGTAAAATTTGCTGAAGTCTTGAAAAGATGGGAGCTAAGGTTACATGGTCAGAGAACAGTGTCACTGTTTCTGGACCACC
ACGAGATTTTTCTGGTCGAAAAGTCTTGCGAGGCATTGATGTCAATATGAACAAGATGCCAGATGTTGCCATGACACTTGCTGT
TGTTGCACTATTTGCTAATGGTCCCACTGCTATAAGAGATGGTATGGTTTAGCTGTTGTTTTGCTCAAGAGCTTGTTTTACA
TATTTGTGGTCAAGAGCGGTTAGCTGTTTTTTTTTAAATTGTGGTTAATGAAATTATTATAATTATACTAATATTGAAATTGG
ATCACTAACCATGTGAAATGCTTGAATTTTAGCTTGAAAACCTCTTTGTGGATGATTTTTCTTTATCTATGTAGTGTGGGGCA
TCTATGTTGTTCTTTAAGCTTTGTGCATAGTTGTACAACCTGGTCTGTGGGCTGGTCCAGTCTTACTCATGACTGTCTTTTGC
AGCAAACCTGGTTAAACTTGGGTGACCTGTTGACCCACCCAGATTGGCCTGTTCTTTTTAAATAAACTCCAAAAGGCTACTTAT
AAGATTTCAACATGATACTTGAATGACCACCCTTACTTTAAAGGTCATTATGCCATCAGACCCCTTGATTCTCTGTTCACTTATGT
TCTTATTCTATTATTTTTAATTATATTATTATCAACGATCTGATCTTTGTACATGATGCTGGACAATCATCAAAGCTAGTTTG
GTTACATCATATAATACCTTTTTTTTCAATAATTATTTTTCCCATAAATATATTTATATGTATTTTTTAAACAATATTCTGGGGAA
ATTTTTTTTTCTGTTTCTTTTTCTGGTTTGAATACTATTTCAATGACTGGGCCTTATTATTTCTGGTTTGGGTTATACAACGT
CCTTTGATGTACTTTTGAATGCTTCAATAGTATTTTTCAATCATGGAAGGCACTAGAGTGCAGTGCATATTGCACAAGGTTCT
TTAATGGCATCTTGAATTTGTTAGAACATGGAGTTATGATATACAACCATTCCTATGTCTTCATCTAATAGCTAAAGCTTTTGGC
GTAGTTGGTTAACATGGTATTGGAATCTTATTTTAAAGGTCCATCTTATTCGCAAGTACAAGGCAGGTGGACCTGCGCATTATT
CACGTGCCAGGCTCAAAGGGATTTTGTATGAGGGGGAATTTTGAATATAATATAGAATCATTCATGTGGTTACCTATCA
TGTGTCAACTCAAGTTTTTGTCTAGTTGTATTATTGCAGTGTCTAAACTAGGCATGATCTTCTGTGGAAGGAAATTTAACCTAA
GGAACCTGAATGCTTCTTGTCTGAGATCTTATTTTTTTTCTCCAATCTTTTAACTTGAAAGGTTTTAGTTGTATCTATAAAG
GGTGCAGAATTAGGGGGTCAGCTTTTCTGTTGTAAGCGTGAATTAAGTGCATTTTATGTTGTTCCCTATTTTATACATTTGAACT
ATCAACCATATCATTTAGCAAACCTCTTTGTTGCTCAGATTCCCATTTATTCTTGTTTCCTCTATTTTTTAGTGGCAAGTTGGAGA
GTTAAAGAGACTGAGAGGATGATAGCAATCTGCACAGAAGTCAAGAAAGTCTTGCTAATTCCTTTATGGTTTCTATATTACTGG
ACTTTTTACATCTCACTGACCTACTACTGTCTTGGTATTTTCACTAGGAGCAACAGTTGAAGAAGGTCTGATTACTGTGTGATT
ACTCCACCTGAGAAAATTGAATGTCACAGCTATAGACACATATGATGACCACAGAATGGCCATGGCATTCTCTCTTGCTGCTGT
GGGGATGTTCCAGTAACCATCAAGGATCCTGGTTGCACCAGGAAGACATTTCTGACTACTTTGAAGTCCTTGAGAGGTTAAC
AAAGCACTAAGCATTTTTGTACATTGAGTAGGGAAGAGAGAGATATATATAAATACTCACAAAGCAGTGAGTATATGGCTTG
CTTTTGTCTAAACATTCCTTTATAAGGACTTGAGATAATTTGTATTGTTTAAAGAGCCATTGGTTCTGTTGTATCAAAGTAAT
TTAATTTTCAGTACCGACTTGGCTCTACTCATATGTGGTGGTGTACATTGCATCTTGCATTTGATTCCATATCTATTGGGATGG
GACCATACATTTTTTGTATTATTAAAGTCAAACATATCAGATAATATGTGGTGACCAGAAA