



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



Análisis funcional de los genes *BAG* en *Physcomitrium patens*

Santiago Rondán
Tutora: Alexandra Castro



Licenciatura en Ciencias Biológicas

Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias,
Universidad de la República

Diciembre, 2024.
Montevideo, Uruguay.

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a todo el BMV por haberme recibido. Siempre estuve muy a gusto trabajando con ustedes y me hicieron sentir muy bien, en un ambiente en el que he aprendido mucho de todas ustedes al mismo tiempo que nos hemos divertido. Quisiera destacar muy especialmente a Alex por haber confiado en mí, por las oportunidades, y sobre todo por la paciencia. Tus enseñanzas me han hecho crecer muchísimo este año y estoy muy contento de que hayas sido vos quien me acompañó durante esta etapa.

A mis padres, su amor me ha brindado un soporte fundamental todos estos años y siempre, les agradezco por mostrar tolerancia y acometimiento. A mis hermanas por las charlas, por el aguante, por ser ejemplos de tenacidad e ingenio.

También a todos los profesores que tuve en la facultad, que me mostraron cariño por la biología, su pasión me volvió a despertar la curiosidad y eso lo voy a atesorar para siempre.

A mis amigos y amigas gracias a todos por estar, a los de siempre y a los que se han sumado en el camino hace menos tiempo. Sepan que han contribuido a mi formación y sobre todas las cosas a mi desarrollo como persona.

Tabla de contenidos

Abreviaturas.....	4
Resumen.....	6
1. Introducción.....	7
1.1 <i>Physcomitrium patens</i>	8
1.2 Genes <i>BAG</i> y su relevancia en la tolerancia al estrés.....	9
1.3 Genética reversa y edición génica con CRISPR-Cas9.....	12
1.3.1 Uso de <i>Physcomitrium patens</i> en genética reversa.....	12
1.3.2 CRISPR-Cas9 como herramienta en genética reversa.....	13
1.3.3 Edición génica con CRISPR-Cas9.....	13
2. Hipótesis de trabajo.....	16
3. Objetivos.....	16
3.1 Objetivo general.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4. Materiales y métodos.....	17
4.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.....	17
4.2 Cepas y cultivo de microorganismos.....	17
4.3 Vectores.....	17
4.4 Transformación de <i>E. coli</i>	18
4.5 Diseño de ARNs guía y construcciones.....	19
4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	20
4.6.1 Cebadores.....	21
4.7 Preparación y análisis de ácidos nucleicos.....	22
4.7.1 Extracción de ADN plasmídico.....	22
4.7.2 Extracción de ADN genómico vegetal.....	22
4.7.3 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	23
4.7.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	23
4.7.5 Recuperación de ADN a partir de gel de agarosa.....	23
4.8 Transformación de <i>P. patens</i>	23
4.9 Selección de eventos editados de <i>P. patens</i>	25
4.10 Análisis de secuencias.....	26
4.11 Análisis de la ploidía relativa por citometría de flujo en plantas editadas de <i>P. patens</i>	26
5. Resultados y discusión.....	27
5.1 Diseño de ARN guías para <i>PpBAG1-3</i> y <i>PpBAG8</i>	27
5.2 Generación de las construcciones génicas editar <i>PpBAG1-3</i> y <i>PpBAG8</i>	28
5.3 Transformación de protoplastos de <i>P. patens</i>	30
5.4 Análisis de los transformantes.....	32
5.4.1 Screening de transformantes.....	32
5.4.3 Análisis de ploidía para líneas knockout <i>PpBAG3</i>	38
6. Conclusiones y Perspectivas.....	40
7. Referencias.....	41
8. Anexo.....	48

Abreviaturas

Nombre	Descripción
aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
<i>BAG</i>	<i>Bcl-2-associated athanogene</i>
Cas	Endonucleasa
crRNA	ARN CRISPR
CRISPR	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas
dNTP	desoxirribonucleósido trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
GFP	Proteína fluorescente verde
HW	medio Hoagland's
ICE	Interferencia de ediciones CRISPR
Indel	Inserción/delección
IPCC	Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático
LB	medio Luria-Bertani
MPM	Marcador de peso molecular
NHEJ	Unión de extremos no homólogos
PAM	Motivo adyacente al protoespaciador
pb	pares de base
PCD	Muerte celular programada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol

Nombre	Descripción
PI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
PRMB	Medio de regeneración de protoplastos base
PRML	Medio de regeneración de protoplastos, líquido
PRMT	Medio de regeneración de protoplastos, superior
<i>P. patens</i>	<i>Physcomitrium patens</i>
rpm	Revoluciones por minuto
sgRNA	ARN guía
TAE	buffer Tris acetato EDTA
TE	buffer Tris EDTA
tracrRNA	ARN trans-activador
Tm	Temperatura de fusión
UV	Luz ultravioleta
μL	Microlitro

Resumen

El cambio climático representa uno de los mayores desafíos ambientales con consecuencias profundas y generalizadas para diferentes ecosistemas y por ende para la sociedad humana. El cambio climático se manifiesta a través de fenómenos extremos como la alteración de los patrones de precipitaciones, la acidificación de los océanos y el aumento de las temperaturas globales. Estas variaciones climáticas afectan directamente al crecimiento de los cultivos, lo que puede tener consecuencias devastadoras para la producción de alimentos. Entender cómo las plantas toleran estas condiciones adversas es vital para desarrollar estrategias que mitiguen el impacto del cambio climático. La familia *Bcl-2-associated athanogene* (*BAG*) ha sido identificada como un grupo evolutivamente conservado de co-chaperonas que regulan procesos celulares clave, incluyendo la muerte celular programada (PCD) y las respuestas al estrés. Estudios recientes han identificado el papel de los genes *BAG* de las plantas en estos procesos. Sin embargo, su función en la tolerancia al estrés, especialmente en plantas primitivas como los musgos, sigue sin explorarse.

Estudios previos sobre *Physcomitrium patens*, llevados a cabo en el laboratorio en donde se realizó este trabajo, han proporcionado información sobre la estructura, organización y perfiles de expresión de los genes *BAG* bajo varios tratamientos de estrés. Se identificaron diez genes *PpBAG*, cuatro de los cuales (*PpBAG1-3* y *PpBAG8*) mostraron una inducción significativa en respuesta al estrés térmico (37 °C) y durante la recuperación del mismo. Este incremento en su expresión se correlacionó con la inducción de genes autofágicos, como *ATG8* y *NBR1*, lo que sugiere un posible papel en la regulación de la autofagia bajo condiciones de estrés.

Para investigar más a fondo, en este trabajo de tesis, utilizamos la tecnología CRISPR-Cas9 para generar mutantes *knockout* para *PpBAG1-3* y *PpBAG8*. Diseñamos cuatro ARNs guía dirigidos a estos cuatro genes, cuidando la selección de sitios *off-target*, y los clonamos en plásmidos pMK-Cas9 y pMH-Cas9. Se optimizaron técnicas de transformación de protoplastos de *P. patens* (de tipo salvaje y una línea *PpATG8e::GFP-PpATG8e*). Se optimizaron técnicas de *screening* mediante análisis por PCR para las transformaciones realizadas en el genotipo salvaje, logrando transformaciones exitosas y validando mutaciones en *PpBAG3* por secuenciación de Sanger.

Los resultados obtenidos hasta el momento revelan la eficiencia del sistema CRISPR-Cas9 en *P. patens* y confirman su potencial para la generación de las líneas *knockout*, abriendo la posibilidad de explorar el uso de los genes *PpBAG* en cultivos de interés agronómico para aumentar su tolerancia al estrés térmico y mitigar los efectos del cambio climático.

1. Introducción

El cambio climático representa uno de los principales desafíos medioambientales de nuestro tiempo, con consecuencias profundas y generalizadas para diversos ecosistemas. El fenómeno se manifiesta a través de diversos eventos, como cambios en patrones de precipitación, acidificación de océanos, y el aumento sostenido de la temperatura global (IPCC). Estos eventos de extremos climáticos se vuelven cada vez más frecuentes, destacando la sequía y el calor extremo, siendo perjudiciales para la agricultura y la seguridad alimentaria (**Zscheischler et al., 2018**).

En particular, las variaciones en condiciones climáticas como la temperatura, afectan directamente al crecimiento, el desarrollo y distribución geográfica, calidad y productividad de las plantas cultivadas, pudiendo tener consecuencias devastadoras para la seguridad alimentaria (**Gourdji et al., 2013**). Las plantas como organismos sésiles, han desarrollado una serie de respuestas adaptativas para optimizar su desarrollo en función de fluctuaciones adicionales y los extremos de temperatura. Entre estas respuestas se incluyen procesos como el termoperiodismo, la termo-morfogénesis, la vernalización y estratificación por frío, y las respuestas a temperaturas extremas (**Casal & Balasubramanian, 2019**).

Este contexto demanda la necesidad de profundizar en el estudio de las bases moleculares implicadas en las respuestas a condiciones de estrés asociadas con el cambio climático y sus efectos sobre el rendimiento y calidad de los cultivos. Comprender estos mecanismos es crucial para desarrollar estrategias que aseguren la sostenibilidad agrícola frente a un clima cambiante. Diversos estudios en plantas modelo han permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos que subyacen a estas respuestas (**Bita & Gerats, 2013; Gazol & Camarero, 2022**). Con esto en cuenta, identificar y caracterizar genes vinculados a la tolerancia al estrés podría ser clave para comprender mejor estos mecanismos. La respuesta a la seguridad alimentaria podría encontrarse en mejoras genéticas para reducir la sensibilidad a los cambios de temperatura y los avances biotecnológicos hacen cada vez más posible explorar estas mejoras (**Lobell & Gourdji, 2012**).

Las adaptaciones a las condiciones extremas del hábitat terrestre se presume que constituyen fenómenos muy antiguos dentro del reino vegetal. Los musgos (briófitas), primeras plantas adaptadas a la vida terrestre, son un grupo particularmente interesante debido a su capacidad de resistencia a la desecación y otros factores de estrés ambiental (**Proctor et al., 2007**). Aunque no tienen interés agrícola directo, los musgos pueden proporcionar información valiosa para mejorar cultivos agrícolas al servir como modelos para el estudio de los mecanismos moleculares de respuesta al estrés.

1.1 *Physcomitrium patens*

Las briofitas representan uno de los linajes más antiguos de las plantas terrestres, marcando una etapa clave en la colonización de los ambientes terrestres. Estos organismos poseen un ciclo de vida predominantemente haploide, lo que las distingue de las plantas vasculares. Estudios moleculares indican que la separación entre musgos y plantas vasculares ocurrió al menos hace 496 millones de años, en el período conocido como Ordovícico (**Zimmer et al., 2007**). Estos organismos poseen un ciclo de vida predominantemente haploide y características fisiológicas como la poiquilohidria, que les permite tolerar fluctuaciones extremas en la disponibilidad de agua (**La Farge et al., 2013**). La adaptación de los musgos al hábitat terrestre se basa casi exclusivamente en la tolerancia al estrés, y logran sobrevivir a ciclos de deshidratación y rehidratación, sobreponiéndose al daño oxidativo que estas situaciones generan (**Proctor et al., 2007**).

Los musgos cumplen varios roles fundamentales a nivel ecosistémico, entre los que se encuentran la generación de hábitats para diversos organismos, el transporte de agua hacia el suelo, y cumplen un rol en la reducción de la escorrentía y pérdida del suelo, ayudando a prevenir la erosión del mismo y mantener su humedad (**Gall et al., 2024**).

Physcomitrium patens (*P. patens*), un modelo vegetal ampliamente utilizado, presenta ventajas para realizar estudios de genética reversa por su alta tasa de recombinación homóloga, por lo que tradicionalmente se ha utilizado como modelo vegetal para realizar ensayos de reemplazo alélico. Su ciclo de vida se basa en la alternancia de dos generaciones, una fase predominante haploide gametofítica que produce gametos, y otra diploide esporofítica donde se producen las esporas.

La propagación de *P. patens* se genera a partir de esporas haploides, las cuales producen una estructura filamentosa denominada protonema, que está compuesto por dos tipos de células: el cloronema, con numerosos cloroplastos, y el caulonema, que es escaso en este organelo. Dichas estructuras crecen en dos dimensiones y a partir de algunas de sus ramificaciones, las células pueden diferenciarse para crecer en tres dimensiones generando estructuras más complejas como los gametóforos, que son formados por estructuras del tipo de hojas, rizoides y los órganos sexuales (**Figura 1**).

Este patrón de desarrollo sencillo, sumado a su crecimiento a 23°C lo hace un organismo fácil de manejar en el laboratorio. La predominancia de la fase haploide del ciclo de vida del musgo *P. patens* lo hace un excelente modelo de estudio para emplear técnicas de edición génica como CRISPR-Cas, ya que las ediciones se hacen sobre un único alelo, facilitando tanto la generación de líneas *knockout* como el *screening* de mutantes (**Schween et al., 2003**).

El tamaño estimado del genoma de *P. patens*, determinado por citometría de flujo, es de 511 Mb (**Schween et al., 2003**). Este presenta secuencias altamente repetidas, donde el 57% del ensamblado está compuesto por elementos transponibles, repeticiones en tándems y

segmentos de genes adquiridos desde otros organismos. La anotación de genes más reciente (v6.1) integra datos de lecturas largas realizadas con Oxford Nanopore y un mapeado con la tecnología Hi-C, y es una versión presuntamente sin intervalos vacíos (*gaps*). El ensamblado fue generado por Bi y colaboradores en 2024, actualizando la versión anterior v3.3 hecha por Rensing y colaboradores y fusionadas con predicciones *de novo* realizadas en el nuevo ensamblado. Esta última versión tiene sólo 26 cromosomas, ya que el cromosoma 27 fue integrado al 25. (Bi et al., 2024; Rensing et al., 2020).

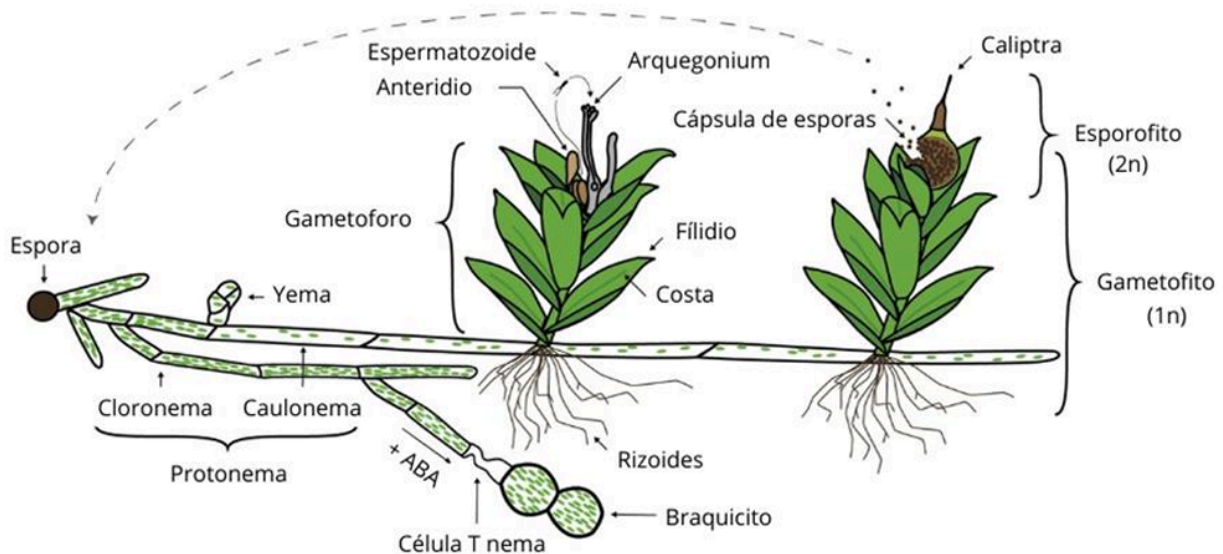


Figura 1: Ciclo de vida de *P. patens*. Esquema que ilustra los diferentes estadios de desarrollo del musgo y sus tejidos. La espora germina dando lugar a dos tipos de tejidos: el cloronema y el caulonema. Del caulonema secundario se genera una yema, la cual se divide para dar lugar al gametofito. El gametofito se encuentra formado por rizoides y hojas. Además, se muestra el desarrollo del esporofito, su maduración y la liberación de esporas nuevamente. Tomado y modificado de **Strotbek et al. (2013)**.

1.2 Genes *BAG* y su relevancia en la tolerancia al estrés

La muerte celular programada (PCD, por sus siglas en inglés) es un proceso esencial para mantener la homeostasis en los tejidos, y en plantas constituye un mecanismo de regulación de múltiples procesos fisiológicos como el desarrollo de semillas, la germinación, el crecimiento, la reproducción y la senescencia. Además, la PCD actúa como un mecanismo de defensa contra patógenos y condiciones ambientales poco favorables (Li et al., 2017; Zhou et al., 2021). Dentro de este contexto, la familia de genes *BAG* (*Bcl-2-associated anthanogene*) en plantas ha sido identificada y se la vincula a funciones relacionadas a la regulación de la muerte celular (Thanthrige et al., 2020).

Los genes *BAG* pertenecen a una familia multigénica evolutivamente conservada, que incluye homólogos en organismos que van desde levaduras hasta animales, y que también están presentes en plantas (Kabbage & Dickman, 2008; Froesch et al., 1998; Sondermann et al., 2001). Los genes *BAG* codifican proteínas, anti-apoptóticas altamente conservadas, que

interactúan directamente con chaperonas como Hsp70 a través de su dominio BAG, una región conservada ubicada en el extremo C-terminal (**Sondermann et al., 2001**). Se ha reportado que algunos miembros de esta familia, tras ser clivados, se encuentran involucrados en la regulación de la autofagia, un proceso de degradación de macromoléculas que permite reciclar componentes celulares dañados o innecesarios, lo cual es esencial para la respuesta al estrés y el desarrollo (**Bassham & Crespo, 2014; Gamberdinger et al., 2011; Liu & Bassham, 2012; Pettinari et al., 2022; Rosati et al., 2011**).

La función de los genes *BAG* ha sido bien caracterizada en plantas vasculares, se han identificado distintas funciones desde la regulación de canales de transporte de potasio, cierre y apertura de estomas, y se los ha vinculado con mecanismos de tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico (**Arif et al., 2021; Locascio et al., 2019**). Sin embargo, su rol en especies no vasculares, como el musgo *P. patens*, aún no ha sido exhaustivamente estudiado. Estudios previos en el laboratorio han provisto información sobre la estructura génica, organización, filogenia y perfiles de expresión de los genes *BAG* bajo estrés térmico a 37 °C. Estos estudios revelaron la existencia de diez genes miembros de esta familia *PpBAGs* (**Tabla S1**). En particular, se ha observado que cuatro de estos genes *PpBAG1*, *PpBAG2*, *PpBAG3* y *PpBAG8*, se inducen significativamente en la primera hora de exposición a un tratamiento de estrés térmico a 37°C (**Figura 2**). Adicionalmente, dicho tratamiento también indujo la expresión de los genes de autofagia como *ATG8* y *NBR1* (**Figura S1**).

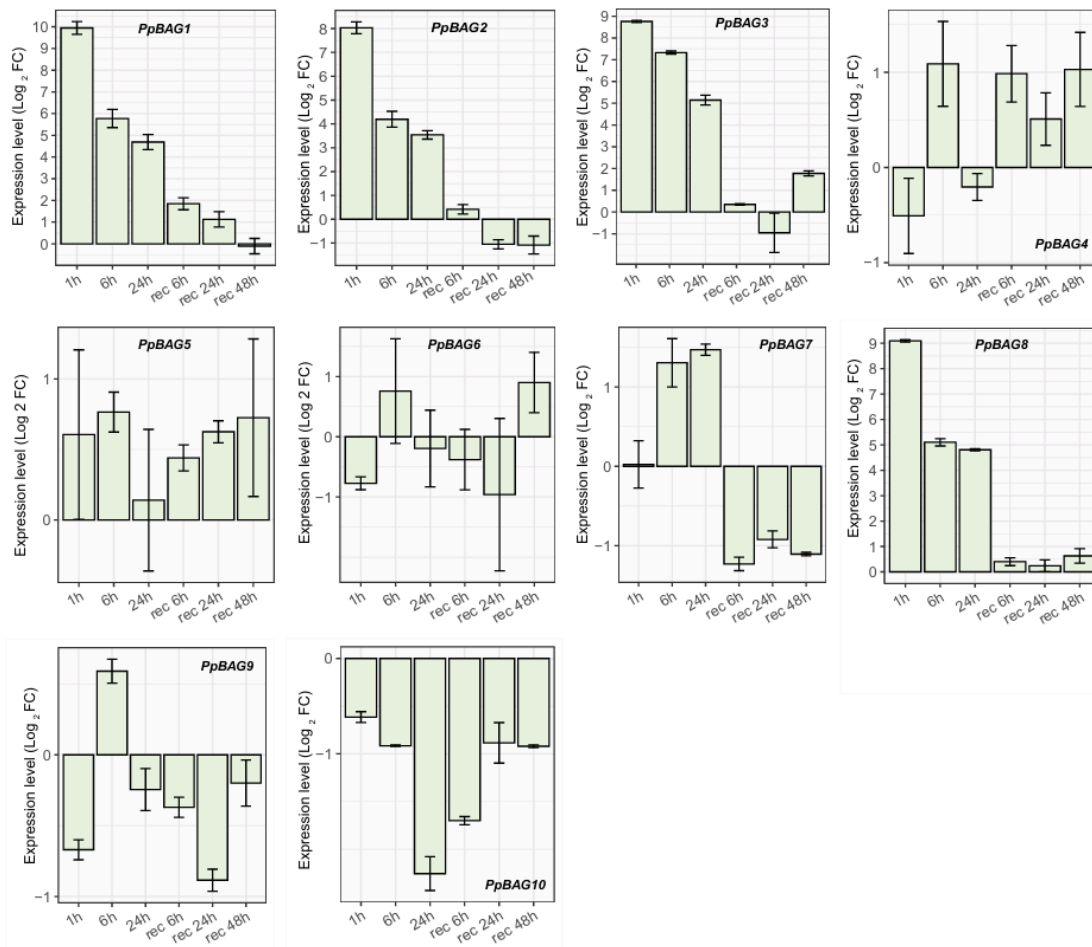


Figura 2. Niveles de expresión de genes *PpBAGs* durante y después del estrés térmico. Análisis de RT-qPCR de los genes *PpBAGs* sometidos a un tratamiento de estrés térmico a 37°C durante 1, 6 y 24 horas, y posterior recuperación durante 1, 6, 24 y 48 horas. El gen *EF1α* se utilizó como gen de referencia. Los niveles de expresión en los tejidos tratados son relativos al nivel correspondiente en los tejidos no tratados en los puntos de tiempo indicados. Se realizaron tres réplicas biológicas (n=3) y los valores representan el promedio $\pm$ desviación estándar. Tomado y adaptado de (Castro et al., 2020).

De estos, los *PpBAG1*, *PpBAG2* y *PpBAG3* comparten una estructura génica similar, no cuentan con intrones, tienen una predicha localización nuclear y presentan un alto grado de similitud en sus dominios proteicos (**Figura 3**) (Castro et al., 2020). Esto último permite, en caso de querer editar estos genes, emplear técnicas moleculares como CRISPR-Cas. Esta similitud ofrece una ventaja a la hora de aplicar técnicas de edición génica, como CRISPR-Cas, ya que un único ARN guía (sgRNA) podría dirigirse a varios genes simultáneamente, facilitando la edición de múltiples objetivos de manera eficiente. Por otro lado, *PpBAG8* presenta un intrón y un tamaño significativamente mayor, lo que lo diferencia estructuralmente de los demás miembros (**Figura 4**).

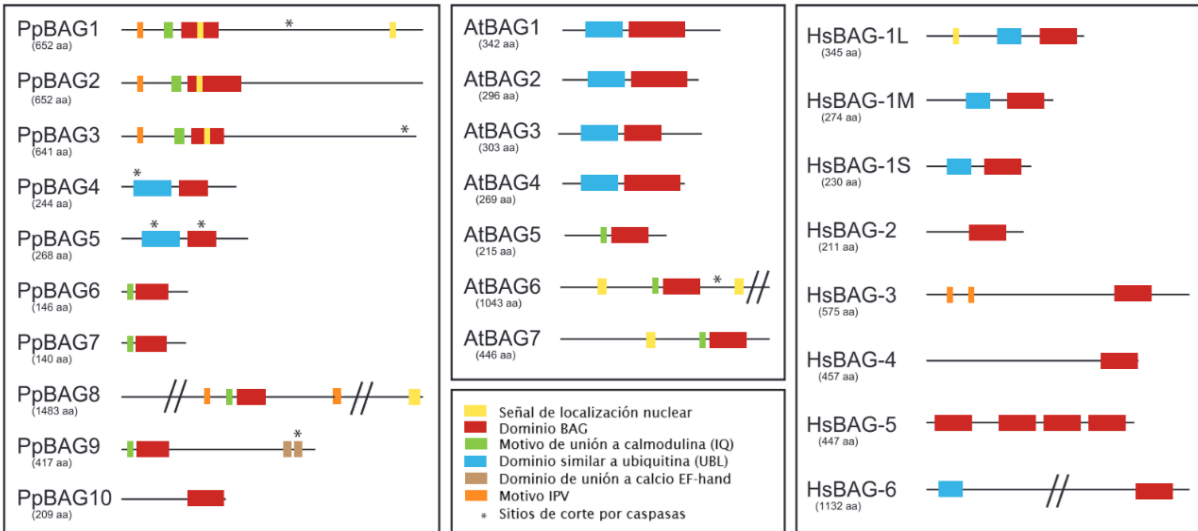


Figura 3. Dominios de las proteínas PpBAG de *Physcomitrium patens*, identificadas mediante la base de datos SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>), comparadas con las proteínas BAG de humanos (Hs) y *Arabidopsis thaliana* (At). Los cuadrados en rojo, verde, azul, naranja, marrón y amarillo indican, respectivamente, el dominio BAG, el motivo de unión a calmodulina (IQ), el dominio similar a ubiquitina (UBL), el motivo IPV, el dominio de unión a calcio EF-hand y la señal de localización nuclear. Los posibles sitios de corte por caspasas están marcados con un asterisco. La longitud de cada proteína, en aminoácidos, se muestra debajo de cada secuencia BAG. Tomado y adaptado de Castro et al., 2020.

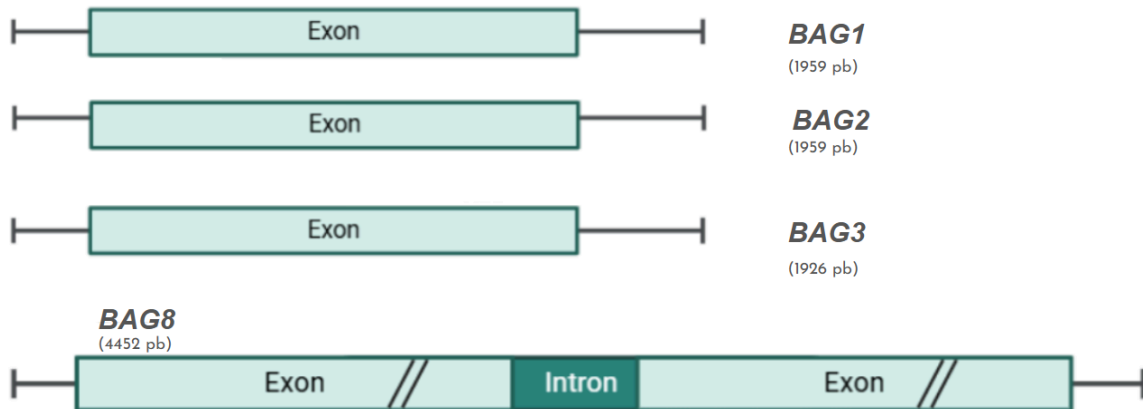


Figura 4. Estructura génica de *PpBAG1*, *PpBAG2*, *PpBAG3* y *PpBAG8*. *PpBAG1-3* cuentan con un único exón, no tienen intrones y tienen una estructura muy similar, *PpBAG8* es aproximadamente el doble de tamaño de los otros tres genes y tiene un intrón. Los genes *PpBAG1*, *PpBAG2*, *PpBAG3* y *PpBAG8* están distribuidos en el genoma de *P. patens* en los cromosomas 13, 26, 4 y 19 respectivamente. El tamaño del marco abierto de lectura para los cuatro genes se muestra en la figura.

1.3 Genética reversa y edición génica con CRISPR-Cas9

La genética reversa es una herramienta clave en biología molecular que permite estudiar la función de genes de interés al modificar su actividad, para luego analizar las consecuencias fenotípicas resultantes. A diferencia de la genética directa, donde se parte de un fenotipo para identificar el gen subyacente, la genética reversa parte del gen de interés para investigar su impacto en el organismo. Esto es posible gracias a tecnologías avanzadas que permiten modificar la actividad génica a nivel de ARNm, ADN, o incluso en su regulación transcripcional o postraduccional.

1.3.1 Uso de *Physcomitrium patens* en genética reversa

P. patens resulta interesante para realizar estudios de genética reversa debido a su alta tasa de recombinación homóloga (**D. G. Schaefer, 2002**), que permite una integración precisa de fragmentos de ADN exógeno en su genoma. Esta característica es aprovechada para realizar transformaciones estables, donde el ADN exógeno se integra directamente en el genoma. Esto puede significar una ventaja a la hora de generar líneas transgénicas estables que permitan su estudio a través de las generaciones, ya que el ADN introducido se mantiene sin la necesidad de que una presión selectiva esté actuando a su favor.

1.3.2 CRISPR-Cas9 como herramienta en genética reversa

Entre las aproximaciones de la genética reversa, la generación de mutantes mediante métodos dirigidos se ha convertido en una estrategia ampliamente utilizada. Estas mutaciones pueden ser provocadas mediante técnicas como el ARN de interferencia (RNAi), el uso de oligonucleótidos antisentido como los morfolinós, o tecnologías de edición genómica como CRISPR-Cas9 (**Jinek et al., 2012**). Cada método ofrece ventajas dependiendo del organismo modelo y de los objetivos del estudio. La llegada de tecnologías como CRISPR-Cas9 ha revolucionado los estudios de genética reversa al ofrecer una herramienta precisa y eficiente para editar el genoma de una amplia variedad de organismos. CRISPR-Cas9 utiliza una nucleasa guiada por ARN (sgRNA, *single guide RNA*) para realizar cortes específicos en el ADN, que luego son reparados por mecanismos celulares como la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la recombinación homóloga (HDR). Esta capacidad ha permitido generar mutaciones dirigidas que afectan específicamente la función de genes de interés.

La llegada de tecnologías de edición génica, como CRISPR-Cas9, ha revolucionado los estudios de genética reversa al permitir una manipulación precisa del genoma en una amplia gama de organismos (**Wang & Doudna, 2023**). Particularmente en *P. patens*, esta técnica está siendo cada vez más utilizada, facilitando mutaciones dirigidas con alta especificidad y eficiencia (**Collonnier et al., 2017; Mallett et al., 2019; Trogu et al., 2021; Yi & Goshima, 2020**). Una ventaja clave de este enfoque es que, al ser un sistema inestable, no deja restos de

ADN exógeno integrados en el genoma del organismo transformado, lo que minimiza preocupaciones sobre la presencia de material genético residual (**Wu et al., 2023**).

1.3.3 Edición génica con CRISPR-Cas9

El sistema CRISPR-Cas9 consiste en un RGEN (*RNA Guided Endonucleases*), en donde la nucleasa, generalmente la Cas9, es llevada a su sitio blanco mediante un ARN guía único (*single guide RNA*) que puede hibridar en una región de complementariedad con el ADN que será clivado por la nucleasa. Este sistema tiene ventajas respecto al uso de otras nucleasas en términos de simplicidad, accesibilidad, costo y versatilidad (**Bortesi & Fischer, 2015**).

En bacterias este sistema constituye un sistema de inmunidad adquirida, y emplea pequeños ARNs interferentes CRISPR (*crRNA*) los cuales se combinan con el ARN transactivador (*tracrRNA*) para activar y guiar a la Cas9 (**Deveau et al., 2010**) a su sitio blanco. Con el fin de facilitar el uso de este sistema como herramienta de edición genómica, el complejo *crRNA-tracrRNA* puede diseñarse como un único ARN guía (*single guide RNA*) conteniendo todas las características necesarias para la unión con la Cas9 (**Figura 5**), y la interacción con la secuencia blanco (**Jinek et al., 2012**). Una secuencia de ARN guía normalmente ronda en los 20 nt de largo, y puede ser diseñada en muchas plataformas de libre acceso.

Un prerequisite para que ocurra un corte en el sitio de edición, es la presencia del motivo conservado PAM (Motivo adyacente al protoespaciador). Este motivo en general consiste en una secuencia 5'-NGG-3' para el caso de la Cas9 (**Jinek et al., 2012**). La endonucleasa Cas9 reconoce este sitio y realiza un corte a unas tres pares de bases corriente arriba de dicho motivo. Esto es una limitante para el diseño de ARN guías porque esta secuencia es un requisito para que la Cas clive el ADN, por lo que estos deben ser diseñados en regiones del genoma que cuenten con dicha secuencia.

El hecho de que los organismos eucariotas carezcan del sistema CRISPR-Cas9 es una ventaja para utilizarlo como herramienta de edición génica ya que no requiere de factores endógenos del hospedero para actuar, y debido a que la interacción entre el ARN guía y el ADN es del tipo Watson y Crick, se puede determinar fácilmente los sitios donde es probable que se generen mutaciones fuera del sitio blanco (*off-targets*). Es por eso que las estrategias para reducir las mutaciones *off-target*, apuntan a un mejor diseño del ARN guía en el cual se evita que hibride a más de una secuencia blanco. CRISPR-Cas9 puede programarse para la generación de *indels*, y para que esto ocurra en un gen de interés, la rotura de doble cadena generada por la Cas9 debe ser reparada mediante NHEJ (*Non-homologous end joining*), que genera reparaciones imperfectas e indefinidas y no requiere de un ADN molde para la reparación. A través de esta vía pueden ocurrir inserciones o deleciones aleatorias en el sitio de edición que alteren el marco abierto de lectura (ORF) de la proteína codificada por el gen blanco, pudiendo generar un cambio en su secuencia aminoacídica, o la generación de un codón *stop* prematuro que dé lugar a una proteína trunca, es por ello que el diseño de los guías es más favorable ubicarlos lo más cerca posible del extremo N-terminal de la proteína que se verá afectada por la edición, de manera de asegurar la pérdida de función total del gen de interés (**Bortesi & Fischer, 2015**).

En plantas el uso de esta tecnología ha permitido modificar secuencias regulatorias de un gen con alguna característica agronómica de interés, y se propone como herramienta para generar plantas libres de transgenes. Para ello se emplean métodos basados en la expresión transitoria de Cas9 y un ARN guía ya sea por la introducción del complejo Cas9/ARN guía o la incorporación de construcciones que expresen Cas9 y ARN guía pero que permanezcan extracromosómicos, con el fin de que dichos componentes puedan ser removidos por segregación, pero transmitiendo la edición generada a la progenie de la planta (Fort Fossali, 2018; Wu et al., 2023).

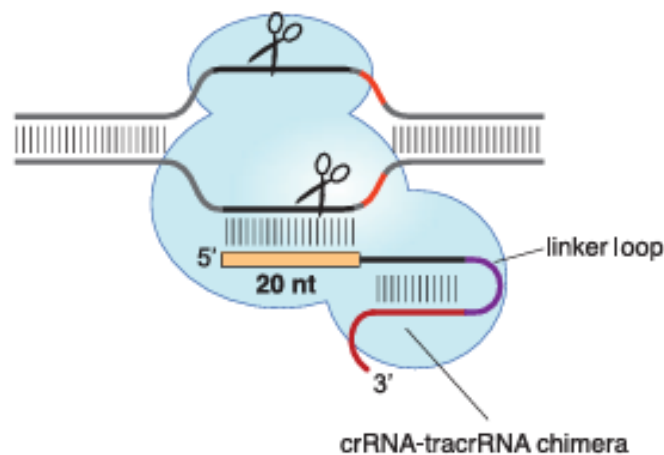


Figura 5. Esquema de un sistema CRISPR-Cas9 utilizando un ARN guía quimérico (crRNA-tracrRNA). El sistema está formado por una molécula de ARN guía que incluye un tramo de 20 nucleótidos (nt) que se empareja con la secuencia diana del ADN. El crRNA-tracrRNA quimérico está conectado a la proteína Cas9, la cual, al reconocer el emparejamiento del ARN con la secuencia del ADN, induce un corte en el ADN objetivo. La imagen muestra la estructura del ARN guía quimérico, con el bucle de enlace (*linker loop*) y las regiones 5' y 3' del ARN. Tomado de Jinek et al., 2012.

2. Hipótesis de trabajo

Considerando los antecedentes expuestos, pensamos que los genes *PpBAG1*, *PpBAG2*, *PpBAG3*, y *PpBAG8* podrían presentar funciones similares posiblemente vinculadas a la regulación de la autofagia y a la tolerancia al estrés térmico. Aquellos individuos que no cuenten con estos genes podrían exhibir estas funciones alteradas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar la función de los genes *PpBAG1*, *PpBAG2*, *PpBAG3* y *PpBAG8* en procesos relacionados con el desarrollo y las respuestas al estrés, enfocándose en comprender su interrelación con la autofagia. Este estudio tiene como propósito generar líneas *knockout* para estos genes y evaluar su papel en la respuesta a condiciones de estrés térmico.

3.2 Objetivos específicos

- Diseñar ARNs guía específicos para la edición de los cuatro genes seleccionados mediante la tecnología CRISPR-Cas9.
- Generar construcciones que permitan la expresión de la proteína Cas junto con los ARNs guía diseñados.
- Transformar dos líneas de *P. patens*, una de tipo salvaje (*wild type*) y una que exprese el marcador *ATG8:GFP*, para generar líneas *knockout* de los cuatro genes en ambas variantes.
- Genotipar las líneas transformantes para confirmar la edición exitosa de los genes seleccionados.

4. Materiales y métodos

4.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Se utilizó el musgo *Physcomitrium patens* (*P. patens*) Grandsen tipo salvaje (D. Schaefer et al., 1991), y la línea reportera *PpATG8e::GFP-PpATG8e* que permitirá monitorear los procesos de autofagia (**Sanchez-Vera, 2017**). Los cultivos vegetales fueron mantenidos y subcultivados *in vitro* en placas de Petri en medio Hoagland's BCDAT (1.6 g/L Hoagland's, 1 mM MgSO₄, 1.8 mM KH₂PO₄ pH 6.5, 10 mM KNO₃, 45 µM FeSO₄, 4 mM tartrato de amonio, 1 mM CaCl₂, 10 g/L de agar) sobre celofanes estériles, según fue descrito por **Ashton & Cove, 1977**. Para la micropropagación se emplearon pinzas estériles para tomar parte de las colonias y transferirlas a medio nuevo. El protonema fue generado a partir de la maceración de colonias en un mortero estéril con 2 mL de agua bidestilada estéril. Los pasajes del tejido vegetal se realizaron en una cámara de flujo laminar en condiciones de asepsia cada una semana utilizando un Ultra-Turrax®, herramienta que permite disgregar el protonema sin generar daños significativos a las células. Este procesamiento hace que la regeneración del tejido sea más uniforme. En cada pasaje se realizan 2 nuevas placas con el fin de tener un respaldo en caso de contaminación, y adicionalmente se hace una placa control con LB donde se inocula una gota del preparado para anticiparse a posibles contaminaciones. Las plantas fueron crecidas a 22°C con un fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad y un flujo de fotones de 50 µmol.m⁻².s⁻¹.

4.2 Cepas y cultivo de microorganismos

Para las transformaciones se utilizaron células competentes de la cepa Top10 de *Escherichia coli* (*E. coli*) generadas en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal. Los cultivos de *E. coli* se incubaron en medio Luria-Bertani (1 % bacto-triptona, 0.5 % extracto de levadura, 1 % NaCl) tanto líquido como sólido (con el agregado de agar 1.5 %). Los cultivos se crecieron a 37 °C toda la noche y los líquidos con agitación (180 rpm).

4.3 Vectores

Se emplearon los vectores pMK-Cas9 y pMH-Cas9 descritos por **Mallett et al., 2019**. Ambos vectores están diseñados para expresar la nucleasa Cas9 bajo el control del promotor Ubiquitina de maíz, lo que asegura su expresión en *P. patens*. El vector pMH-Cas9 incluye un gen de resistencia a higromicina, mientras que pMK-Cas9 contiene un gen de resistencia a G418, lo que permite la selección eficiente de plantas transformadas. Adicionalmente, ambos vectores poseen un gen marcador de resistencia a ampicilina para su propagación en *E. coli*. Ambos vectores presentan sitios de restricción para las enzimas PmeI y SnaBI que facilitan la inserción de secuencias específicas. Además, incluyen el promotor de ARN polimerasa III U6, bajo el cual fueron introducidos los ARN guía diseñados (Figura 6) (**Wu et al., 2023**).

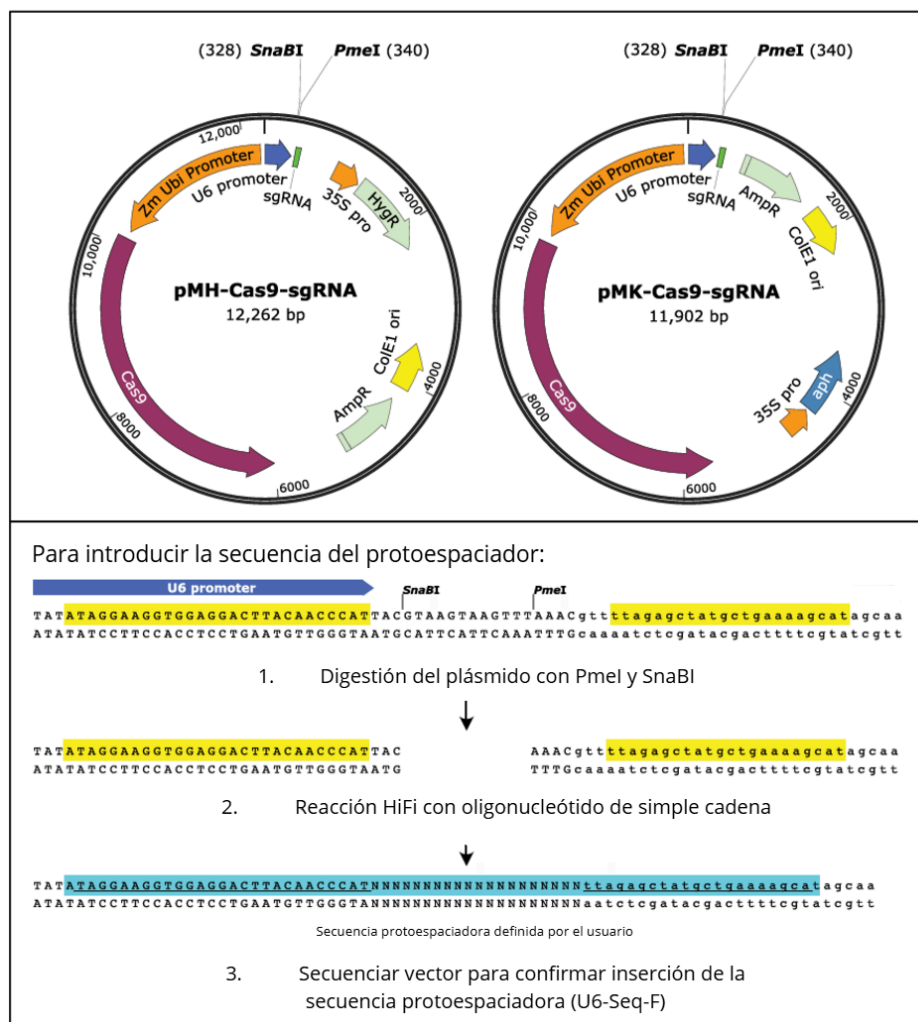


Figura 6. Generación de construcciones para la expresión transitoria de Cas9/sgRNA. Nivel superior: Mapas de los vectores pMH-Cas9-sgRNA y pMK-Cas9-sgRNA, diseñados para la expresión de SpCas9 bajo el control del promotor de ubiquitina de maíz y del sgRNA impulsado por el promotor U6 de *Physcomitrium patens*. Nivel inferior: Procedimiento para integrar una secuencia de protoespaciador en la región entre el promotor U6 y la secuencia del sgRNA. El plásmido se linealiza con las enzimas de restricción PmeI y SnaBI. La secuencia de protoespaciador se sintetiza como un oligonucleótido de cadena sencilla (destacado en celeste), que incluye regiones complementarias al plásmido (subrayadas y resaltadas en amarillo en el mapa del vector). El protoespaciador tiene la secuencia N20-NGG orientada en sentido 5' a 3'. Tomado y adaptado de (Wu et al., 2023).

4.4 Transformación de *E. coli*

Para la transformación de bacterias electrocompetentes, se utilizaron 100 μ L de células de la cepa TOP10, y se agregaron 4 μ L de la reacción de ensamblado con el *mastermix* NEBuilder

(New England Lab). Se transfirió la mezcla a una cubeta de electrotransformación pre enfriada y estéril. Las células fueron electroporadas utilizando un electroporador Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad), con un voltaje 2.5 kV, capacitancia 25 µF, resistencia en paralelo de 200 Ω y un pulso de 3.5 ms. Se agregaron 300 µL de medio LB líquido y se incubó a 37 °C durante una hora con agitación. Por último, se sembró en placa con LB sólido con Ampicilina a una concentración de 100 µg/mL y se incubó a 37 °C durante toda la noche. De las colonias que crecieron, algunas fueron seleccionadas para largar nuevos cultivos en LB líquido con Ampicilina 100 µg/mL para posteriormente almacenarlas con glicerol 40% a -80 °C.

4.5 Diseño de ARNs guía y construcciones

Para el diseño de los 4 ARNs guía se utilizó la herramienta CRISPOR, (<https://crispor.gi.ucsc.edu/>; **Concordet & Haeussler, 2018**) seleccionando secuencias con alta especificidad y eficiencia de corte. Los ADN que van a dar lugar a los ARN guías fueron sintetizados por la empresa Macrogen con secuencias flanqueantes al protoespaciador (5'-ATAGGAAGGTGGAGGACTTACAACCCAT-GUUA-GTTTTAGAGCTATGCTGAAAAG-3') requeridas para su incorporación en los vectores pMH-Cas9 y pMK-Cas9 tal como se describe en la Figura (**Figura 6**).

La generación de las construcciones pMH-Cas9-guía y pMK-Cas9-guía se realizó mediante la digestión de los vectores con las enzimas de restricción PmeI (New England Biolabs. Cat.: R0560S) y SnaBI (New England Biolabs. Cat.: R0130S). Las reacciones de digestión se llevaron a cabo durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, los vectores digeridos fueron separados en un gel de agarosa al 1%, y las bandas correspondientes fueron purificadas según lo descrito en el punto 4.6.5.

Se incubaron los ARN guía diseñados (**Tabla 1**) para que las regiones que flanquean al protoespaciador hibriden con el vector linearizado utilizando el *mastermix* de ensamblado de ADN *NEBuilder® HiFi* (New England Biolabs. Cat.: E2621L) que cuenta con enzimas que funcionan en un mismo buffer, una exonucleasa que crea un extremo 3' libre que facilita la unión de fragmentos complementarios en una región de solapamiento, una ADN polimerasa que complete el espacio entre cada fragmento hibridado y una ADN ligasa que sella los *nicks* en el ADN ensamblado (**Wu et al., 2023**). Se realiza la reacción cargando 1 µL de vector linearizado (5 ng/µL), 1 µL de ADN que dará lugar al ARN guía (0.2 µM total), y 2 µL de *mastermix* de ensamblado de ADN 2x NEB HiFi. La reacción se incubó durante 1 hora a 50°C antes de transformar bacterias *E. coli* TOP10 según se detalla en el punto 4.4

Tabla 1: Diseño de ARNs guía con brazos de homología requeridos para clonado en vectores pMK-Cas9 y pMH-Cas9. Los ARN guía tienen su diana en los genes PpBAG 1, 2, 3 y 8 como es indicado en su nombre.

Nombre del ARN guía	Secuencia
Sg37-PpBAG1:2	ATAGGAAGGTGGAGGACTTACAACCCATT <u>TACCTATACGCACCGCTGTAG</u> TTTTAGAGCTATGCTGAAAAG
Sg73-PpBAG2:3	ATAGGAAGGTGGAGGACTTACAACCCATT <u>TGTATCCTGGGGCGCAGCCG</u> TTTTAGAGCTATGCTGAAAA G
Sg1011-PpBAG3	ATAGGAAGGTGGAGGACTTACAACCCATGCTTCGTTCCATAGACCAATGTTTTAGAGCTATGCTGAAAAG
Sg64-PpBAG8	ATAGGAAGGTGGAGGACTTACAACCCATGCGCAAACCATATAATACGGGTTTTAGAGCTATGCTGAAAAG

4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las amplificaciones en cadena de la polimerasa (PCR) fueron realizadas en un Termociclador SimpliAmp™ (Thermo Fisher Scientific™).

Las amplificaciones de ADN genómico fueron realizadas a partir de extracciones de ADN genómico (Ver punto 4.7.2) de *P. patens* utilizando la enzima ADN polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific™ Cat.:F534L) con cebadores *Forward* y *Reverse* que flanquean la región de interés (**Tabla 2**) diseñados en el *software* Primer3Plus, en un volumen final de 20-50 µL según especificaciones sugeridas por el proveedor. Las condiciones de PCR utilizadas fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial 3 minutos a 98°C; 30 ciclos de 15 segundos a 98°C, 20 segundos de *annealing* a 58°C y 30 segundos de extensión a 72°C; y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa 1%-2%, purificados según el punto 4.7.5 y enviados a secuenciar a MacroGen para su análisis como se detalla en el punto 4.10.

A partir de ADN genómico obtenido según la extracción de ADN genómico detallada en el punto 4.7, utilizando una concentración de ADN de 20-40 ng/µL se realizó el *screening* de clones con la estrategia de PCR de competencia (Harayama & Riezman, 2017). Fueron diseñados los cebadores para evaluar edición en los genes *BAG1*, *BAG2*, *BAG3*, y *BAG8*. Dos oligos *forward* y *reverse* flanquean el sitio de edición para generar un amplicón grande y una sonda interna hibrida sobre el sitio de corte y se empareja con el cebador *forward* o *reverse* para generar un amplicón pequeño (**Figura 7**). El sitio de corte se encuentra sobre el extremo 3' de la sonda interna de forma que en los individuos editados no pueda formarse un amplicón pequeño. En los individuos sin editar se podrán formar los dos amplicones, mientras que en los editados no se podrán formar los dos amplicones debido a que la sonda interna no hibrida con igual eficiencia sobre un sitio editado.

Las PCR de competencia fueron realizadas en un Termociclador Simpli Amp™ (Thermo Fisher Scientific™). Fueron utilizadas extracciones de ADN genómico y se realizó el ensayo de PCR de competencia con la enzima ADN polimerasa Supertaq (Bioron. Cat.:102010) en un buffer de reacción NH₄ completo 10x (pH 8.8, 0.1% Tween 20, 20 mM MgCl₂) empleando los cebadores mostrados en la **Tabla 2**, en un volumen final de 30 µL. Las condiciones de PCR de competencia utilizadas fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial 2 minutos a 94°C; 35 ciclos de 10 segundos a 94°C, 20 segundos de *annealing* a 56°C y 40 segundos de extensión a 72°C; y una extensión final de 5 minutos a 72°C.

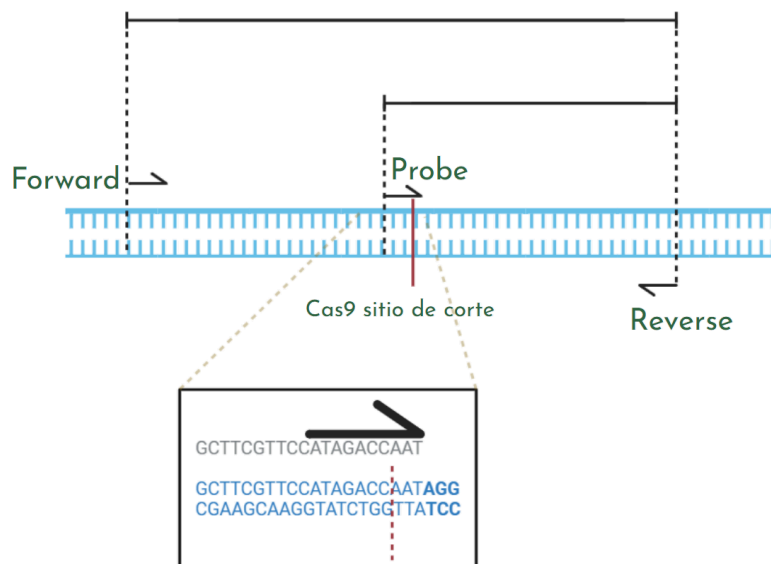


Figura 7. Estrategia de PCR de competencia para la detección de mutaciones en el sitio de corte de Cas9. Se diseñaron tres cebadores, dos que flanquean el sitio de corte (*Forward* y *Reverse*) generando un amplicón grande, y uno que hibrida sobre el sitio de corte (*Probe*), formando un amplicón de menor tamaño.

4.6.1 Cebadores

Los cebadores fueron diseñados en el *software* Primer3Plus (Bioinformatics) para el *screening* por PCR de competencia y para enviar a secuenciar clones candidatos. La región en la que hibridan los cebadores para el *screening* se muestra en la **Figura S2**.

Tabla 2: Cebadores para *screening* por PCR de competencia para los genes *PpBAG8* (*Forward*, *probe* y *reverse* 64), *PpBAG1* (*Forward*, *probe* y *reverse* 37), *PpBAG2* (*Forward*, *probe* y *reverse* 73) y *PpBAG3* (*Forward*, *probe* y *reverse* 1011). Cebadores *forward* y *reverse* para controles de ADN ARNr 18S.

Nombre del cebador	Secuencia	Tm (°C)	Tamaños de amplicones generados
F-c64	GGAATCCGGAAGTTGCGA	60.9	<i>Forward</i> y <i>reverse</i> 448 pb
P-c64	CCAATTCAACAACCGCCGTAT	60.1	<i>Probe</i> y <i>reverse</i> 255 pb
R-c64	CCTCGGTTGCTTCTCTTGT	59.9	
F-c37	GGGTTGCGGTTTGTTTAGAA	58.2	<i>Forward</i> y <i>reverse</i> 548 pb
P-c37	ATAACATGTGGGATCCTTACAG	56.0	<i>Probe</i> y <i>reverse</i> 352 pb
R-c37	CCCTCAGGTGTTTGAGAG	58.8	
F-c1011	CGACAGTACAGGAAGCAGA	58.6	<i>Forward</i> y <i>reverse</i> 516 pb
P-c1011	CTGCTTCGTTCCATAGACCAAT	58.9	<i>Probe</i> y <i>reverse</i> 318 pb

R-c1011	ACTCACTGCTGCGATCATTC	58.8	
F-c73	CGACTCTGGACTGATGCTGAATGT	63.1	Forward y reverse 548 pb
P-c73	TGTATCCTGGGGCGCAGCCG	70.6	Probe y reverse 218 pb
R-c73	AACACGAGGCGGAACCTTCTACTTG	63.3	
F-Pp18S	5'-TTGACTCAACACGGGGAAAC-3'	58.4	Forward y reverse 500 pb
R-Pp18S	5'-AGCTGATGACTCGCGCTTAC-3'	60.5	

Tabla 3: Cebadores para la verificación de construcciones y secuenciación de la región editada para el gen *BAG3*.

Nombre de oligonucleótido	Secuencia	Tm (°C)	Descripción
UM2149	GGCGCGCCGAGCTCGAATTCGTCCATTGAAGC	73.9	Cebador diseñado para verificar la inserción del ARN guía bajo el promotor U6 en los vectores pMH-Cas9 y pMK-Cas9
1011rev	GTTGCCTCATTCTTGACTGCG	60.8	Cebador diseñado para secuenciar los productos de PCR y analizar eventos editados para el gen <i>BAG3</i>

4.7 Preparación y análisis de ácidos nucleicos

4.7.1 Extracción de ADN plasmídico

Las extracciones de ADN plasmídico fueron realizadas utilizando el kit de extracción *Zyppy plasmid miniprep* (Zymo Research™ Cat.:D4020). Se midió la concentración de ADN plasmídico utilizando un NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific™) y un Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific™), y corrió en un gel de agarosa al 1 %. Según fuera requerido, las extracciones fueron concentradas con la concentradora de vacío SpeedVac Savant SPD2010 (Thermo Fisher Scientific™). Los plásmidos fueron enviados a secuenciar y posteriormente fueron analizados según se detalla en el punto 4.10.

4.7.2 Extracción de ADN genómico vegetal

Para las extracciones de ADN genómico, se molieron colonias de *P. patens* con nitrógeno líquido en un homogeneizador de tejidos de tipo BeadBeater (Biospec), se agregaron 300 µL de buffer CTAB (Tris 1 M pH 8; EDTA 0.5 M; NaCl 3 M; 0.1 mg de ARNasa; 1 % de β-mercaptoetanol), se incubó a 65°C en un termobloque Accublock™ Digital Dry Bath (Labnet)

durante 30 minutos (mezclando cada 5 minutos por inversión). Se dejó enfriar por 5 minutos, se agregaron 300 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (relación 24:1) y se vortexeó. Se centrifugó durante 4 minutos a 13000 rpm para separar las fases, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregó 300 μ L de isopropanol. Luego se incubó por 15 minutos a -20°C y se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos para precipitar el ADN. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 300 μ L de EtOH 70%. Se centrifugó nuevamente a 13000 rpm durante 5 minutos, se removió el EtOH, se secó el pellet y se resuspendió en 30 μ L de buffer TE (Tris 10 mM - EDTA 1mM) pH 8.0.

4.7.3 Cuantificación de ácidos nucleicos

Se midió la concentración de las extracciones de ADN con el ensayo 1X dsDNA BR Assay (Invitrogen™. Cat.:Q33262) para el Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific™).

4.7.4 Electroforesis en gel de agarosa

Se utilizaron geles de agarosa de 1% a 2%, según fue requerido para resolver distintos tamaños de ADN, utilizando buffer TAE 1x (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M). Se utilizaron varios marcadores de peso molecular según el tamaño de banda esperado. Para productos de PCR de pequeño tamaño se utilizó el marcador comercial *50pb Plus DNA Ladder* (Bioron. Cat.:304007). Para determinar concentraciones y tamaños de ADN plasmídico se utilizó un marcador generado tras la digestión del ADN del fago lambda con la enzima de restricción *Pst*I (Figura 8). A las muestras se le agregó buffer de carga 1X, para que las mismas no se difundan y se pueda visualizar el frente de corrida. El voltaje utilizado fue 100 V. Se utilizó bromuro de etidio como agente intercalante presente en el gel. La visualización de las bandas se realizó en un transiluminador UV.

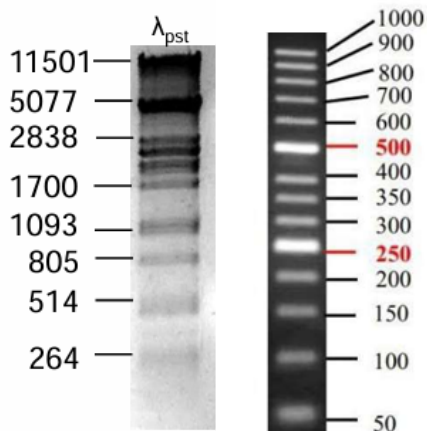


Figura 8. Marcadores de peso molecular. Se indican los tamaños de las bandas generadas en pares de bases para el marcador ADN del fago lambda digerido con la enzima *Pst*I y el marcador comercial 50pb Plus DNA Ladder de Bioron.

4.7.5 Recuperación de ADN a partir de gel de agarosa

La recuperación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa fue realizada utilizando el kit *Zymo clean gel DNA recovery kit* (Zymo Research. Cat.: D4007).

4.8 Transformación de *P. patens*

Para transformar establemente *P. patens* se requiere de células vegetales sin pared o protoplastos. La obtención de protoplastos y su transformación se realizaron siguiendo el protocolo descrito por **Schaefer et al., 1991**.

Se utilizaron tejidos de *P. patens* de tipo salvaje y PpATG8e::GFP-PpATG8e con tres pasajes, y luego de siete días del tercer pasaje se digirió el protonema con Driselasa (Sigma. Cat.: D8037-1G) una mezcla de enzimas de origen fúngico que se encarga de degradar la pared celular rompiendo los enlaces glucosídicos. La digestión se realizó con Driselasa 0.2% y D-manitol 8% durante toda la noche a 22°C. A partir del protonema digerido se obtuvieron protoplastos, células disgregadas y sin pared celular que son permeables a la transformación mediada por polietilenglicol (PEG). Para verificar la correcta digestión del tejido vegetal, se observó en un microscopio invertido (Zeiss. Axio Zoom.V16). Los protoplastos son filtrados con un filtro de 100 micras. Se centrifuga a 700 rpm durante 10 minutos en centrifuga con rotor *swing-out* y se retira la fase con driselasa y manitol. Se agrega igual volumen de D-manitol 8% y se centrifuga nuevamente a 700 rpm durante 5 minutos. Se hacen dos lavados con CaPW (Calcium protoplast wash. Para 200 mL: 16g D-manitol + 1.46g CaCl₂·2H₂O) y centrifugado a 700 rpm durante 5 minutos. Se retira todo el CaPW y se resuspende en solución 3M. Se cuentan protoplastos en una cámara de Neubauer ya que es necesaria una cantidad de al menos 1.6x10⁶ protoplastos/mL. Se incuban 300 µL de protoplastos con 15 µg de ADN en un volumen no mayor a 30 µL y se le añade 300 µL de polietilenglicol (para 10mL de PEG 8000 40%: 4g de PEG 8000 en 10 mL de 0.8g D-manitol + 1 mL 1 M Ca(NO₃)₂ + 100 µL 1 M Tris pH 8.0 + H₂O c.s.p. 10 mL). Se aplica shock térmico de 45°C durante 5 minutos, y se incuba otros 5 minutos más a temperatura ambiente (20°C-25°C). Se agrega CaPW mezclando suavemente luego de cada adición de los siguientes volúmenes: 600 µL, 0.5 mL, 1 mL, 1.5 mL y 2 mL de CaPW. Se centrifuga a 700 rpm durante 5 minutos y se retira todo el CaPW. Se resuspende en 0.5 mL de PRML (Protoplast regeneration media liquid: medio Hoagland's + D-manitol 8% + 1 mL de CaCl₂ 500 mM cada 50 mL) y se le añade 2.5 mL de PRMT (Protoplast regeneration media top: medio Hoagland's + D-manitol 8% + 0.25g Agar Sigma + 1 mL de CaCl₂ 500 mM cada 50 mL) previamente fundido a 45°C. Se plaquea toda la suspensión en una placa de PRMB (Protoplast regeneration media bottom: medio Hoagland's + D-manitol 8% + 5g Agar Sigma para 500 mL) y celofán y se incuba durante 4 días (Figura 9).

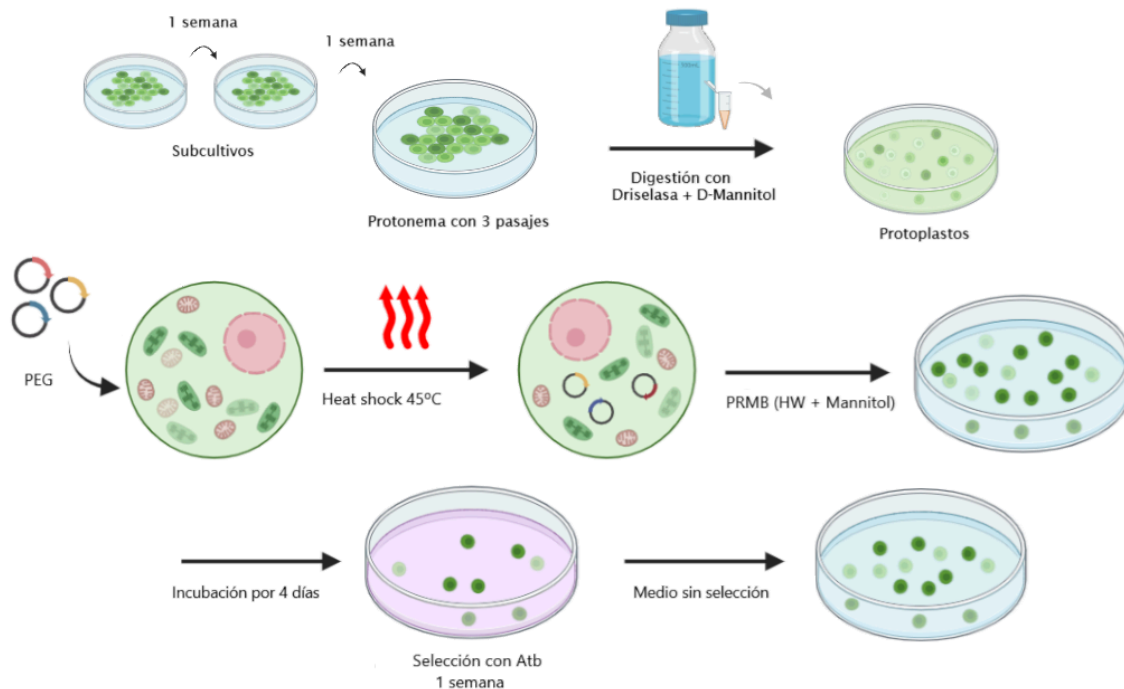


Figura 9: Esquema del proceso de transformación de *P. patens*. El protonema se subcultiva semanalmente durante tres semanas y se digiere el tejido con driselasa para obtener los protoplastos. La transformación de protoplastos se realiza mediante un protocolo mediado por PEG, que incluye un *heat shock* a 45°C. Posteriormente, los protoplastos se incuban en medio PRMB durante cuatro días. Luego se transfieren a un medio de selección suplementado con antibiótico durante una semana, y luego a un medio sin selección para su regeneración.

4.9 Selección de eventos editados de *P. patens*

Se cultivaron los protoplastos sometidos al proceso de transformación en placas con el medio sólido BCDTA con antibiótico sobre celofán durante cuatro días, siendo transferidas a placas con el mismo medio suplementado con el antibiótico correspondiente (concentración final 25 µg/µL para higromicina y 50 µg/µL para G418), permitiendo la selección de eventos editados. Luego de una semana fueron transferidas de manera independiente a un medio Hoagland's sin selección para su posterior caracterización molecular tal como se describe en los puntos 4.8 y 4.10.

4.10 Análisis de secuencias

Las construcciones generadas y los productos de PCR a partir de los clones candidatos seleccionados fueron enviados a MacroGen para su secuenciación. El análisis de las secuencias resultantes se realizó utilizando el software SnapGene (GSL Biotech).

En el caso de las construcciones pMH-Cas9 y pMK-Cas9, SnapGene se empleó para confirmar la incorporación del ARN guía (**Tabla 3**) bajo el promotor U6 de la ARN polimerasa III.

Para los clones candidatos identificados mediante la estrategia de PCR de competencia, se extrajo ADN genómico siguiendo el procedimiento descrito en el punto 4.7.2, y se amplificó la región de interés mediante PCR (detalles en el punto 4.6). Los productos de PCR obtenidos se analizaron con el software ICE (Interference of CRISPR Edits) de Synthego, comparándolos con un control no editado para identificar posibles inserciones o deleciones. Adicionalmente, la herramienta de traducción de secuencias de la plataforma ExPasy (<https://web.expasy.org/translate/>) se utilizó para detectar codones *stop* prematuros en las secuencias resultantes.

4.11 Análisis de la ploidía relativa por citometría de flujo en plantas editadas de *P. patens*

Se analizó el nivel de ploidía de 5 líneas editadas para *PpBAG3* de *P. patens* y se comparó con células de genotipo salvaje, en un citómetro de flujo CyFlow® Space (PARTEC). Para esto se tomó una colonia de 3 semanas de crecimiento de cada línea y cortaron gametóforos con un bisturí hasta disgregar visiblemente el tejido sobre 1 mL de Woody Plant Lysis Buffer (WPB) [Tris-HCl 0.2 M pH 7.5, MgCl₂·6H₂O 4 mM, EDTA Na₂·2H₂O 2 mM, NaCl 86 mM, Tritón X-100 1%, Na₂O₅S₂ 10 mM y PVP-10 1%]. Luego se pasó a través de un filtro de 0.45 µm y se añadieron 25 µL de yoduro de propidio, para marcar el ADN de los núcleos. Las muestras se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante unos minutos. A continuación, se pasó cada muestra por el citómetro por separado empezando la calibración con la muestra del genotipo salvaje. Las mediciones de fluorescencia obtenidas se compararon con las del control no editado para determinar diferencias en la ploidía. Este servicio de análisis fue realizado por el Laboratorio de Evolución y Domesticación en Plantas (LEDP) en la Facultad de Agronomía, UdelaR.

5. Resultados y discusión

En esta sección se presentan y discuten los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de la tesis, cuyo objetivo principal fue la edición dirigida de cuatro genes en *P. patens* (*PpBAG1*, *PpBAG2*, *PpBAG3* y *PpBAG8*) mediante la tecnología CRISPR-Cas9. El enfoque central del trabajo consistió en inducir mutaciones específicas en estos genes y generar líneas *knockout*, con el propósito de estudiar su rol en los mecanismos de respuesta al estrés térmico.

5.1 Diseño de ARN guías para *PpBAG1-3* y *PpBAG8*

Se diseñaron cuatro ARNs guía, siguiendo el protocolo descrito en el punto 4.5 de Materiales y métodos. Para el diseño de cada guía, se consideraron tanto la especificidad como la minimización de sitios *off-target*, priorizando las regiones ubicadas en los primeros exones con el objetivo de generar codones *stop* prematuros y, por ende, proteínas truncadas.

Inicialmente, debido a la alta similitud entre los genes *PpBAG1*, *PpBAG2* y *PpBAG3* a nivel de estructura génica y proteica (**Figuras 3 y 4**), se exploró la posibilidad de diseñar un único ARN guía capaz de editarlos simultáneamente. Sin embargo, las diferencias a nivel de secuencia nucleotídica entre estos genes hicieron inviable esta estrategia, ya que un ARN guía único no habría garantizado especificidad y habría generado sitios *off-target* en regiones no deseadas.

Finalmente, se diseñó un ARN guía para cada gen, asegurando así una edición precisa. Estos guías se presentan en la **Tabla 1** en el punto 4.5 de Materiales y Métodos. Sin embargo, dado que los genes pertenecen a la misma familia génica y comparten cierto grado de similitud, algunos de los guías diseñados presentan sitios *off-target* en los genes relacionados: el guía 37, dirigido al gen *PpBAG1*, tiene un único *off-target* en *PpBAG2*, el guía 73, dirigido al gen *PpBAG2*, tiene un único *off-target* en *PpBAG3*, el guía 1011, específico para *PpBAG3*, no reporta sitios *off-target* y el guía 64, diseñado para *PpBAG8*, presenta sitios *off-target* en regiones intergénicas con puntajes muy bajos, lo que minimiza su impacto (**Figura 9**).

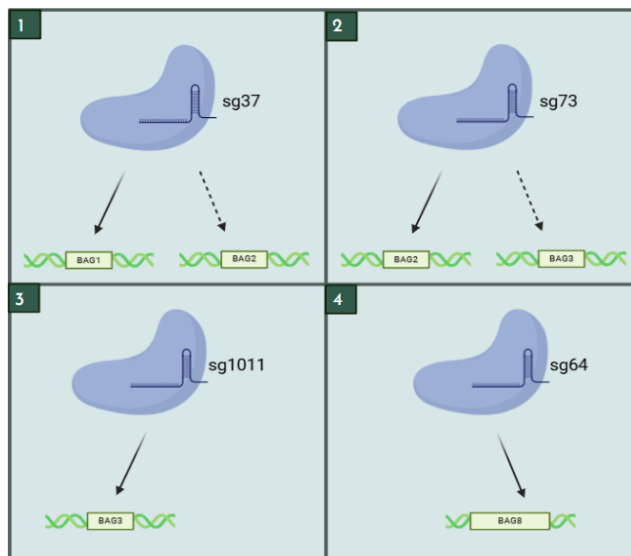


Figura 10. Esquema de ARN guía diseñados para la edición de los genes *PpBAG1-3* y *PpBAG8*. El ARN guía 37 tiene como diana el gen *PpBAG1* y presenta un sitio *off-target* en el gen *PpBAG2*. El guía 73 está dirigido al gen *PpBAG2* con un *off-target* en el gen *PpBAG3*. Los ARN guías 1011 y 64 están dirigidos específicamente a los genes *BAG3* y *BAG8*, respectivamente, sin detección de sitios *off-target*.

5.2 Generación de las construcciones génicas para editar *PpBAG1-3* y *PpBAG8*

Las construcciones fueron generadas incubando los vectores pMK-Cas9 y pMH-Cas9 con las enzimas de restricción PmeI y SnaBI. Las digestiones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, y los fragmentos fueron purificados a partir del gel siguiendo el procedimiento descrito en el punto 4.7.5 de Materiales y Métodos. Las purificaciones fueron corridas nuevamente en un gel de agarosa 1% para estimar concentración y confirmar el tamaño esperado (**Figura 11**).

Los ARN guía se clonaron en los vectores previamente digerir utilizando el *mastermix* de ensamblado de NEB según punto 4.3 de Materiales y métodos. En una primera instancia los ARNg 37 y ARNg 73 fueron clonados en los vectores pMH-Cas9 y pMK-Cas9 respectivamente, para obtener construcciones que puedan seleccionarse de forma independiente con dos antibióticos distintos. Debido a que la línea reportera *GFP-PpATG8* ya es una línea resistente a higromicina, se decidió incorporar el resto de los ARN guía (ARNg 1011 y ARNg 64) en vectores pMK-Cas9.

Una vez realizada la reacción de ligación, se transformaron células electrocompetentes de la cepa *TOP10* de *E. coli*.

Al sembrar las transformaciones en un medio selectivo, se desarrollaron varias colonias. Se seleccionaron y purificaron cuatro transformantes de cada constructo y se procedió a realizar cultivos líquidos para extracciones de ADN plasmídico, el cual fue enviado para su secuenciación a la empresa Macrogen utilizando un cebador específico del vector como se indica en la Tabla 3. El análisis de las secuencias en el visualizador Snapgene permitió verificar la incorporación de los guías bajo el promotor de la ARN polimerasa III U6 en las distintas construcciones.

Se generaron los plásmidos pMH-Cas9-guía37, pMK-Cas9-guía73, pMK-Cas9-guía1011, pMK-Cas9-guía64. En la **Figura 12** se muestra como ejemplo la construcción pMK-Cas9-ARNg1011, el resto de construcciones fue verificada del mismo modo.

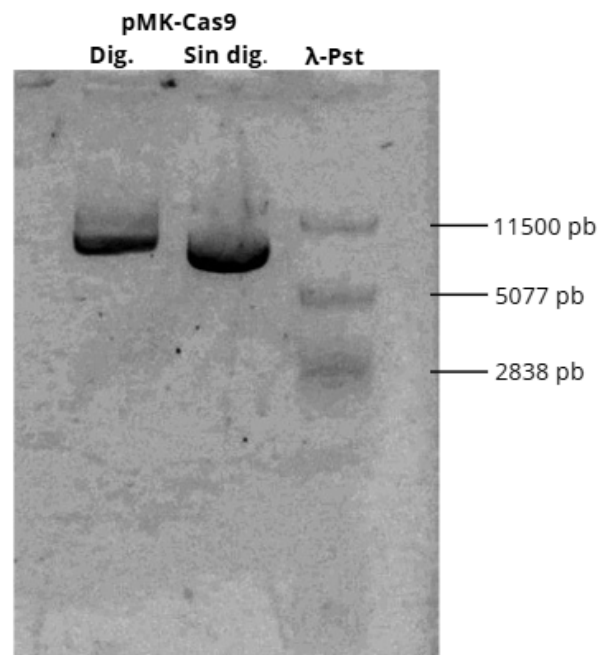


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para el análisis de la digestión del vector pMK-Cas9. El orden de carga es el siguiente: 1) plásmido pMK-Cas9 digerido con las enzimas de restricción *Sna*BI y *Pme*I, 2) plásmido pMK-Cas9 sin digerir, y 3) marcador de peso molecular λ /PstI.

Como se indicó anteriormente, la línea reportera *PpATG8e::GFP-PpATG8e* cuenta con resistencia a higromicina, por lo que tener los guías en el vector pMK-Cas9 permite seleccionar transformaciones en esta línea, pero es una desventaja a la hora de transformar con más de una construcción a la vez ya que el antibiótico de selección es el mismo (G418) para tres de las construcciones. Esto representa un problema para poder discriminar entre clones que han incorporado diferentes construcciones o entre aquellos que han incorporado una sola construcción frente a aquellos que han incorporado más de una.

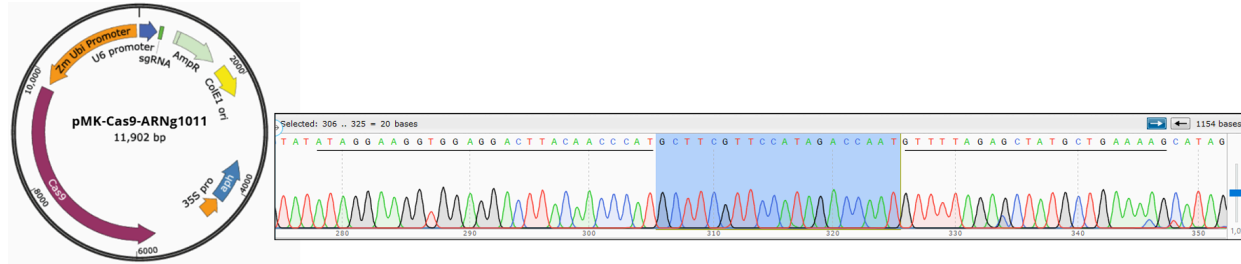


Figura 12. Construcción pMK-Cas9-ARNg1011. La inserción del ARN guía 1011 (señalada en azul) fue verificada utilizando el software Snapgene. La secuencia subrayada señala los brazos de homología que flanquean al guía, facilitando su integración en el plásmido.

5.3 Transformación de protoplastos de *P. patens*

Las transformaciones fueron realizadas sobre las líneas *P.patens* tipo salvaje y la línea reportera *PpATG8e::GFP-PpATG8e*. Las construcciones purificadas con un kit tal como se describe en la sección 4.7.5 de Materiales y Métodos, fueron utilizadas para la transformación de protoplastos. Se realizaron transformaciones simples, dobles, y triples con una, dos y tres construcciones respectivamente, tanto en un *background* salvaje como en *GFP-ATG8*, cargando 10µg de cada plásmido en un volumen no mayor a 30µL.

En una primera instancia se realizaron transformaciones simples en ambas líneas, pero luego se optó por realizar transformaciones dobles y triples a medida que se fueron generando nuevas construcciones. Las transformaciones realizadas se muestran en la **Tabla 4**. No con todas se siguió adelante con su análisis, principalmente debido a contaminaciones que se detectaron durante la regeneración de los musgos. Inicialmente se obtuvieron muchos clones por transformación, y como esto dificulta su manejo y estudio fueron agrupados para su análisis según se detalla más adelante.

Durante la selección con antibiótico (higromicina y/o G418), las construcciones son retenidas temporalmente en los protoplastos permitiendo la expresión de la proteína Cas9 y del ARN guía. En esta etapa es donde se espera que ocurra la edición del gen o genes de interés. Una vez que se retira la selección las construcciones tienden a perderse en las sucesivas divisiones celulares (**D. Schaefer et al., 1991**). A partir de ajustes realizados en las cantidades de antibiótico con el que fue suplementado el medio de selección, se pudo reducir el número de clones en las últimas transformaciones realizadas. Adicionalmente, para el análisis de las últimas transformaciones se realizaron cambios en la estrategia de *screening* que son detallados en el punto 5.4 de análisis.

Tabla 4. Transformaciones realizadas en las líneas *P. patens* de tipo salvaje y *GFP-ATG8* con las construcciones pMH-Cas9-ARNg37, pMK-Cas9-ARNg73, pMK-Cas9-ARNg1011 y pMK-Cas9-ARNg64 en distintas combinaciones, con el objetivo de editar los genes *PpBAG1*, 2, 3 y 8 respectivamente.

Línea	Transformaciones					
	<i>PpBAG1</i>	<i>PpBAG2</i>	<i>PpBAG1</i> / <i>PpBAG2</i>	<i>PpBAG2</i> / <i>PpBAG3</i>	<i>PpBAG2</i> / <i>PpBAG3</i> / <i>PpBAG8</i>	<i>PpBAG8</i>
Wt	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>GFP-ATG8</i>	✗	✓	✓	✓	✗	✗

Luego de la transformación, los clones fueron sometidos a selección durante una semana. El tiempo de selección utilizado, así como la concentración de antibiótico fueron ajustados para una transformación de tipo inestable, en donde no buscamos la integración de las construcciones al genoma (Wu et al., 2023). Para la línea *P. patens* de tipo salvaje el medio de selección fue suplementado con G418, o con G418 e higromicina según con qué construcciones fue transformada, mientras que para la línea *GFP-ATG8* el medio de selección fue suplementado únicamente con G418. Luego fueron transferidos a medio BCDAT para su regeneración, y al cabo de dos semanas se obtuvieron múltiples clones que son los que crecieron a partir de protoplastos que pudieron retener la construcción (Figura 13).

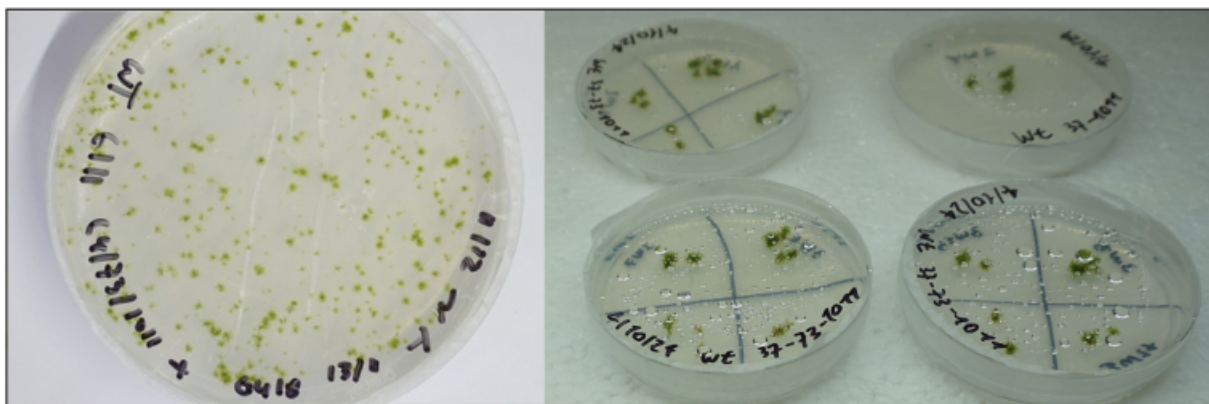


Figura 13. Regeneración de protoplastos Wt (izquierda) y de clones de *P. patens* de tipo salvaje, transformaciones en regeneración triples con las construcciones pMH-Cas9-ARNg37, pMK-Cas9-ARNg73 y pMK-Cas9-ARNg1011 y dobles con pMH-Cas9-ARNg37 y pMK-Cas9-ARNg1011 (derecha).

La retención de la construcción en protoplastos durante la semana de selección no garantiza la edición de los genes de interés, por lo que fueron evaluadas distintas estrategias para analizar todos los clones generados, con el propósito de descartar los falsos positivos, reducir los costos asociados a la mano de obra, en tiempo e insumos necesarios, así como minimizar los costos vinculados al genotipado de los mismos.

5.4 Análisis de los transformantes

5.4.1 *Screening* de transformantes

Al generar tantos clones se exploraron distintas estrategias de *screening* para detectar aquellos individuos que hayan sido editados exitosamente según lo esperado.

Se probó con la estrategia de *pooling*, para la cual se tomó tejido de cuatro clones en regeneración diferentes y se los agrupó para realizar una única extracción de ADN genómico. A partir de la extracción se realizaron amplificaciones de los sitios de interés y luego se envió a secuenciar. Las secuencias fueron analizadas e inicialmente obtuvimos resultados prometedores en donde en algunos grupos (*pools*) observamos tanto inserciones como deleciones en las regiones diana (**Figura 14**). Sin embargo, cuando las muestras del grupo fueron analizadas individualmente, ninguna estaba editada, por lo que se decidió explorar otra estrategia de *screening* y dejar esta para poner a punto en un futuro.

Una de las cosas a tener en cuenta para la puesta a punto es que a la hora de tomar tejido de los clones, se debe asegurar tomar la misma cantidad para que en la extracción de ADN genómico cada individuo esté igualmente representado. Esto se observa en la figura que describe la estrategia (**Figura 14**), en donde la contribución de las secuencias del *pool* es desigual.



Figura 14. Análisis por estrategia de agrupamiento de muestras. A la izquierda se presenta un esquema de la estrategia. Se muestran dos cromatogramas, uno para el grupo editado y otro para una muestra control sin editar, que exhibe una señal uniforme y consistente, correspondiente al alelo wt. Abajo se indica las secuencias producto de la deconvolución de las señales del agrupamiento, su contribución y son detalladas las ediciones en cada una de ellas.

La estrategia de PCR de competencia va a ser de gran utilidad para poner a punto esta estrategia, ya que se podrá armar grupos a partir de individuos que ya hayan sido identificado como editados e individuos sin editar, para evaluar si tomar la misma cantidad de tejido es una opción viable para realizar el *screening* de las transformaciones que hagamos a futuro. En este caso se esperaría ver una mezcla de señales que al deconvolucionar en el *software*

Synthego:ICE mostraría una secuencia sin editar, y otras varias muestras con ediciones ya caracterizadas previamente.

Como esta estrategia no fue efectiva y requiere ajustes para optimizarla, optamos por utilizar la técnica de PCR de competencia descrita por **Harayama & Riezman** (2017), y detallada en la sección 4.6 de Materiales y Métodos. Los cebadores para el ensayo de PCR de competencia fueron diseñados para los genes *PpBAG1*, *PpBAG2*, *PpBAG3* y *PpBAG8* (**Tabla 2**), pero únicamente fue puesto a punto para el gen *PpBAG3* en la línea *P. patens* de tipo salvaje. El conjunto de cebadores para PCR de competencia del *PpBAG2* no fue empleado para el *screening* debido a que el ARN guía diseñado hibrida en una región del gen rica en GC, haciendo que su T_m sea muy elevada respecto a los cebadores *forward* y *reverse* (**Tabla 2**). Esto dificulta que la sonda interna se aparee sobre el sitio de corte del modo requerido (**Figura 7**). Las PCR de competencia realizadas para dicho gen, no pudieron amplificar los controles sin editar de ADN genómico *P. patens* de tipo salvaje según lo esperado, y se observan amplificaciones inespecíficas (**Figura S3**).

Se realizó PCR de competencia según el punto 4.6 de Materiales y Métodos sobre musgos *P. patens* de tipo salvaje transformados con la construcción pMK-Cas9-ARNg1011, ajustando el volumen de ADN cargado en cada reacción según la concentración de cada muestra (**Tabla S2**). Se sembró un control sin editar, y se observó la formación de dos bandas correspondientes a los dos amplicones esperados, de 318 pb y 516 pb. También se observó la formación de dos bandas en el individuo #1, pero en este caso la banda pequeña muestra menos intensidad, lo que sugiere que la sonda no pudo hibridar correctamente sobre el sitio de corte. Los individuos #3, #4, #5, #8, #18 y #20 muestran una única banda, correspondiente a 516 pb, con pérdida total de la banda pequeña sugiriendo una edición del sitio diana. Todas estas muestras fueron candidatas como posibles editados para el gen *PpBAG3* por lo que fueron seleccionadas para mandar a secuenciar (**Figura 15**). Por otro lado, el resto de individuos no mostró ninguna banda por lo que no fueron tomados en cuenta, pero se podría volver a repetir el ensayo para descartar posibles errores en la manipulación. Se realizaron amplificaciones con los primers *forward* y *reverse* para *PpBAG3* (**Tabla 2**), se realizó una amplificación del ADN que codifica para el ARNr 18S, se corrió en un gel de agarosa 1% (**Figura 15**) y se purificó para enviar a secuenciar según se detalla en 4.7.5 punto de Materiales y Métodos.

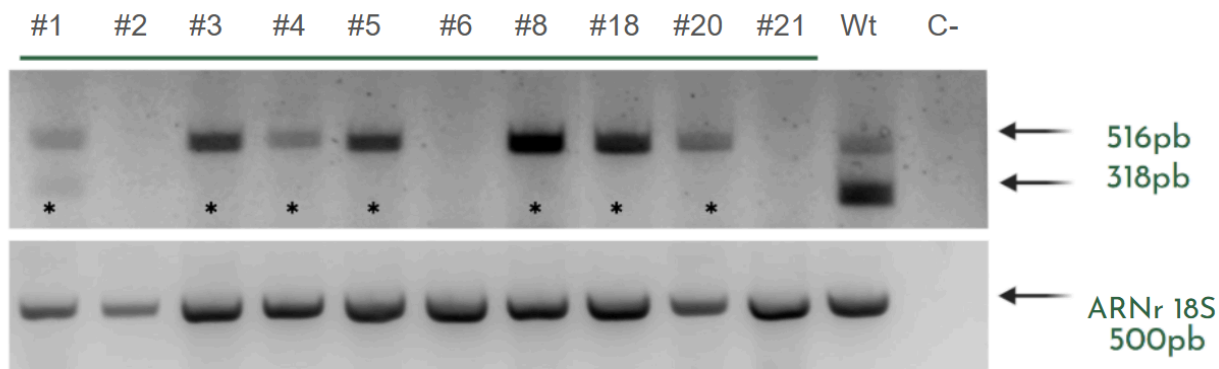


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 2% para el análisis de los productos de la PCR de competencia para el gen *PpBAG3*. En el gel superior, el individuo Wt es un control sin editar y muestra dos bandas, una pequeña y mayoritaria (318 pb), y una banda que migró menos de mayor tamaño (516 pb). El individuo #1 también muestra dos bandas, pero se observa una reducción en la intensidad de la banda más pequeña. En los individuos #3, #4, #5, #8, #18, y #20 la banda pequeña está ausente. El asterisco indica posibles editados. En el gel inferior se observan los productos de PCR con cebadores específicos para el gen del ARN ribosómico 18S como control de carga de ADN. En el control negativo no se incluyó ADN en el mix.

Este método de *screening* representa una herramienta valiosa, dado que durante el proceso de transformación son generados muchos clones, y es imprescindible contar con un mecanismo eficaz que permita identificar aquellos que han sido editados y descartar aquellos individuos que no lo estén. Una vez identificados, los clones seleccionados fueron secuenciados y los resultados fueron analizados utilizando el *software* Synthego: ICE.



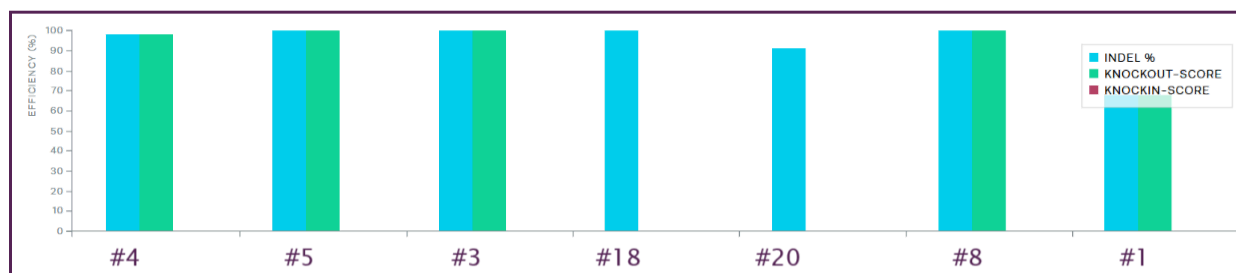
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR con cebadores específicos para el gen *PpBAG3*. MPM corresponde al marcador de peso 50 pb y C- al control negativo sin molde de ADN. Los números corresponden a diferentes candidatos de edición. Wt, genotipo salvaje para el locus analizado.

Los análisis de las secuencias obtenidas mediante Synthego se presentan en la Figura 17B. Para el individuo #1 se reportan dos señales, posiblemente por fusión de dos protoplastos, un fenómeno previamente reportado bajo determinadas condiciones (Grimsley et al., 1977). Un análisis más detallado, revela que en el individuo 1 presenta un alelo wt y otro con una delección de 7 nucleótidos. Esta mutación en un único alelo podría explicar la formación de dos bandas

en el análisis de PCR de competencia así como la pérdida en intensidad de la banda pequeña, como se observa en la (Figura 15). Un patrón similar se observa para el individuo #4, donde también se observaron dos señales posiblemente por fusión de dos protoplastos. En este caso el individuo presenta una delección de un único nucleótido en cada alelo, aunque en sitios diferentes (Figura 17B). Para dicho individuo, se observa que la banda pequeña desaparece en el PCR de competencia para este individuo como se observa en la Figura 15.

En los individuos #18 y #20, se reporta una delección de 9 nucleótidos y una inserción de 6 nucleótidos respectivamente. Si bien estos clones pudieron ser editados, Synthego identificó que no hubo un corrimiento en el marco de lectura, lo que resultó en *score* de *knock-out* de 0% en el gráfico de barras (Figura 17A). Esto adicionalmente fue corroborado utilizando la herramienta de traducción de la plataforma Expsy.

A)



B)

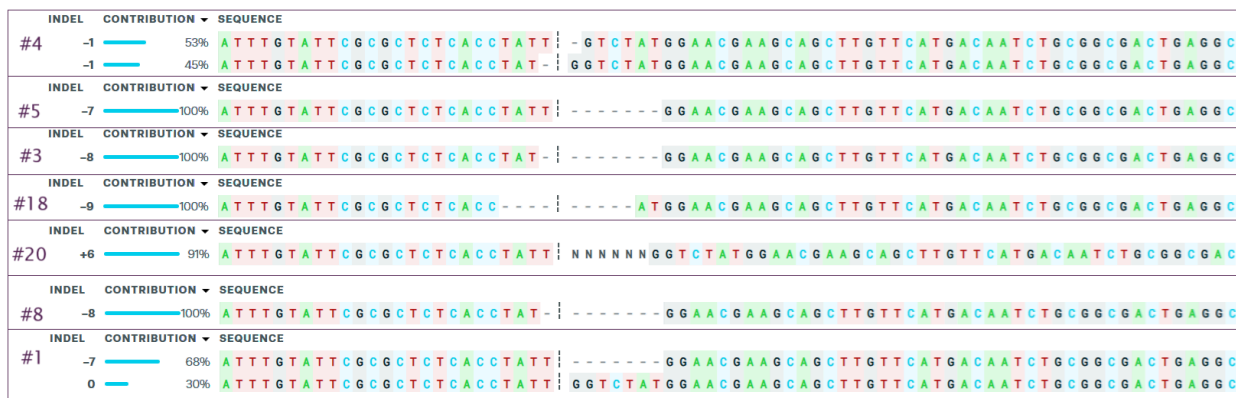


Figura 17. Evaluación de la edición genética en individuos seleccionados mediante el software Synthego ICE. A) Gráfico de barras generado por el software Synthego Interference of CRISPR Edits (ICE) para los individuos seleccionados en el que se muestra la eficiencia de inserciones/delecciones (indels) en celeste, y *knockout-score* en verde. B) Análisis de eventos de edición del genoma a partir de secuenciación de Sanger con la herramienta Synthego ICE. Los indel y la contribución muestran, respectivamente, el tipo de mutación y la eficiencia de edición en la línea analizada. Los sitios de corte se muestran con líneas punteadas verticales, los nucleótidos eliminados con un guión, y la letra 'N' indica la presencia de un pico mixto en el cromatograma.

En cuanto a los individuos #3 y #8, ambos presentaron una delección de 8 nucleótidos, mientras que el individuo #5 mostró una delección de 7 nucleótidos, lo cual puede visualizarse en mayor

detalle en la **Figura 18**. Es importante destacar, que en estos individuos, la PCR de competencia no mostró la banda pequeña (**Figura 15**), lo que resalta la especificidad de la técnica como una herramienta eficaz para realizar un *screening* rápido por PCR y descartar eventos no editados antes de proceder con el análisis de secuenciación.

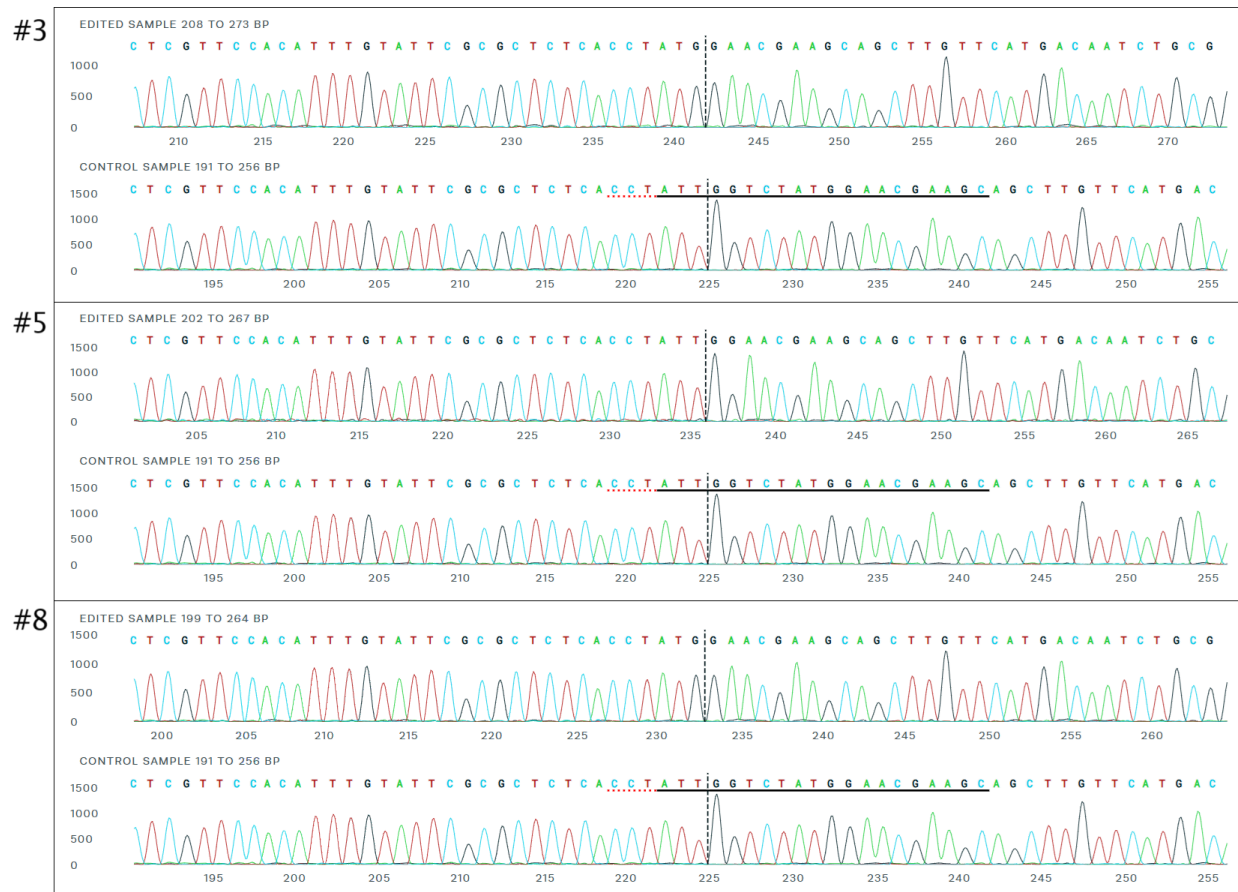


Figura 18. Resultados de la secuenciación de Sanger para *PpBAG3* en individuos #3, #5 y #8 y un control sin editar de tipo salvaje, analizados en el Synthego ICE. La región subrayada indica el sitio donde el guía hibrida, la línea punteada roja indica la secuencia PAM y la línea vertical punteada representa el sitio de corte esperado.

Para los individuos #3, #5 y #8, se realizó un análisis adicional con la herramienta de traducción de Expassy para identificar codones *stop* prematuros (**Figura 19**). Dicho análisis reveló que en todos los individuos editados se forman codones *stop* prematuros, generando una proteína trunca. Los individuos #3 y #8 presentan el mismo perfil aminoacídico ya que cuentan con la misma mutación (una delección de 8 nucleótidos) y generaron un codón *stop* inmediatamente después del sitio de corte de la Cas9. También muestran cambios a nivel de los últimos aminoácidos antes de dicho codón *stop* (**Figura 19B**). En el individuo #5 también se observa varios cambios aminoacídicos antes de un codón *stop* que se encuentra inmediatamente después del sitio de edición (**Figura 19C**).

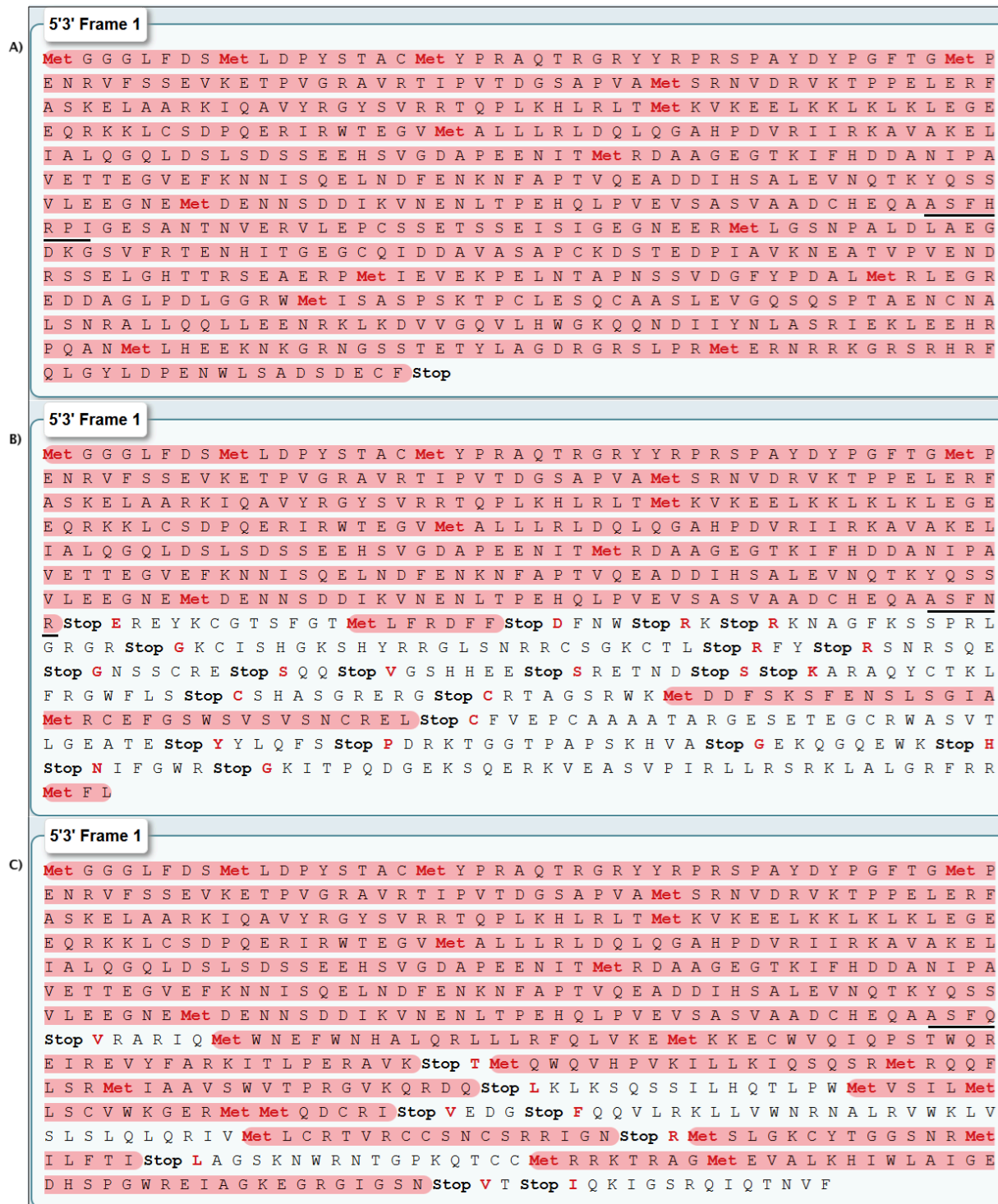


Figura 19. Análisis en la herramienta de traducción de la plataforma ExPASy del marco de lectura en líneas editadas para el gen *PpBAG3*. En rojo aparece resaltado el marco abierto de lectura. La secuencia subrayada en negro indica los aminoácidos correspondientes a la región donde hibrida el ARN guía. **A)** Secuencia aminoacídica del control de *P. patens* de tipo salvaje sin editar. **B)** Secuencia aminoacídica de los individuos editados #3 y #8. **C)** Secuencia aminoacídica del individuo #5.

5.4.3 Análisis de ploidía para líneas *knockout PpBAG3*

Se seleccionaron 5 clones editados para PpBAG3 #1, #3, #4 #5 y #8 para ser analizada su ploidía en relación a la ploidía del genotipo wt. Esto fue necesario dado que el proceso por el cual se generan los protoplastos incrementa la probabilidad de obtener eventos de fusión de células, generando productos diploides que deben ser descartados dada su diferencia con el musgo salvaje (**Schween et al., 2005**) .

En la Figura 20 se observan los 6 histogramas de los individuos analizados. En cada uno de los histogramas se observan dos picos de fluorescencia, uno correspondiente a una cantidad de ADN cercana a 100 (pico de mayor altura) y otro más pequeño en la posición 200 (menor altura). Las muestras wt y #3, #5 y #8, se observa una pequeña población de núcleos con el doble de fluorescencia, correspondiente a células que entraron en mitosis y duplicaron su ADN. Dado que todos los diagramas de los individuos #3, #5 y #8 la misma distribución que el wt, y sumado a los resultados obtenidos en Synthego, se tomaron a estos clones de *P. patens* como líneas editadas para PpBAG3 haploides.

Para los individuos #1 y #4, el pico de 200 tiene una mayor proporción respecto al pico en 100 y además, aparece un pico adicional, en la posición 400 lo que indica que tiene el doble de material genético respecto a una muestra control *P. patens*. Estos resultados siguen la misma línea de los resultados obtenidos del análisis realizado en la plataforma Synthego: ICE, donde estos clones presentan dos alelos para el *PpBAG3*.

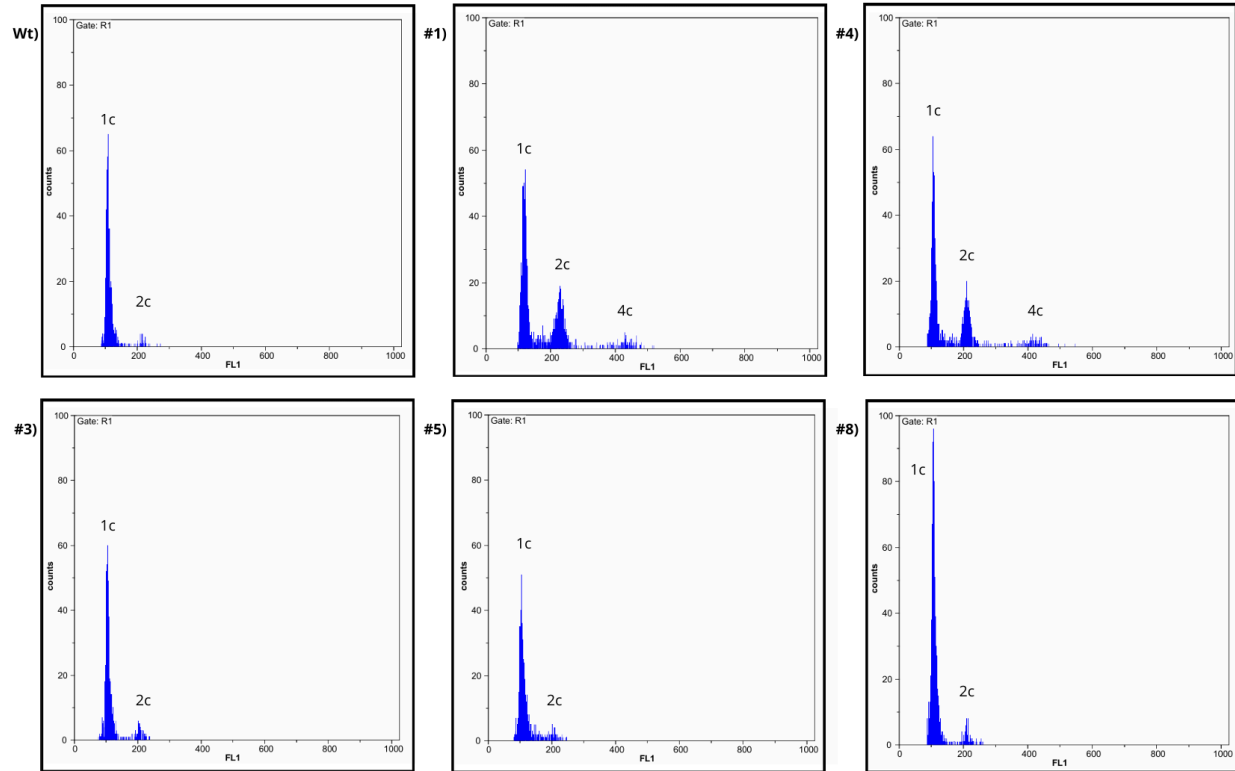


Figura 20. Ploidía relativa de colonias de genotipo salvaje y líneas editadas. Histogramas obtenidos por citometría de flujo de células provenientes de muestras de genotipo Wt, #1, #4, #3, #5 y #8. Se grafica el número de células respecto a la cantidad de ADN que éstas poseen.

6. Conclusiones y Perspectivas

Teniendo en cuenta el propósito del proyecto de determinar la función de los genes *PpBAG1*, *PpBAG2*, *PpBAG3* y *PpBAG8*, este trabajo ha contribuido significativamente al avance en el conocimiento requerido para dilucidar su rol tanto en las respuestas al estrés térmico como vinculado a la autofagia.

Se diseñaron cuatro ARN guía, cada uno dirigido a un gen de interés, evaluando los sitios *off-target* para evitar ediciones no deseadas. Los ADN que codifican para esos ARN guías fueron clonados en las construcciones pMK-Cas9 y pMH-Cas9. Esta etapa significó un paso importante ya que las ediciones realizadas se apoyaron en el correcto diseño de las mismas.

Se realizaron múltiples transformaciones en los genotipos de interés. Las transformaciones fueron puestas a punto para el genotipo salvaje, y el *screening* por PCR de competencia se concentró en las ediciones dirigidas al gen *PpBAG3* con el ARN guía 1011

Resta por caracterizar las transformaciones realizadas en la línea de tipo salvaje con los ARN guías 73 y 64, para los genes *PpBAG2* y *PpBAG8* respectivamente, las cuales actualmente se encuentran en proceso de regeneración. Sobre este mismo genotipo, queda realizar una nueva transformación con el ARN guía 37 dirigido al *PpBAG1*.

En cuanto a la línea *PpATG8e::GFP-PpATG8e* se requiere realizar nuevas transformaciones y análisis para generar mutantes *knockout* en ese contexto genómico, lo que proporcionará información valiosa sobre el rol de estos genes en el proceso de autofagia.

Para lograr analizar las nuevas transformaciones con mayor eficiencia, queda poner a punto el análisis por agrupamiento de muestras que permita realizar un rápido *screening* de los clones. Este enfoque va a ser de gran ayuda sobre todo para aquellos casos en los que el diseño de la PCR de competencia se ve dificultado por la naturaleza del ADN en la región de edición de interés, como es el caso del *PpBAG2*.

Los resultados obtenidos corroboran la eficiencia del sistema CRISPR-Cas9 en el modelo *P. patens* y son prometedores para poder generar las líneas *knockout* restantes. Fenotipar los mutantes generados bajo condiciones de estrés térmico, aportará al entendimiento de la función de los genes *PpBAG1*, *PpBAG2*, *PpBAG3*, y *PpBAG8*. En caso de desempeñar un papel en una mayor tolerancia al estrés térmico, podrían ser de interés en futuras investigaciones en plantas de interés agronómico, con el objetivo de desarrollar cultivos más resilientes a las condiciones de estrés asociadas al cambio climático, como es el aumento gradual de la temperatura global.

7. Referencias

- Arif, M., Li, Z., Luo, Q., Li, L., Shen, Y., & Men, S. (2021). The *BAG2* and *BAG6* Genes Are Involved in Multiple Abiotic Stress Tolerances in *Arabidopsis Thaliana*. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5856. <https://doi.org/10.3390/ijms22115856>
- Ashton, N. W., & Cove, D. J. (1977). The isolation and preliminary characterisation of auxotrophic and analogue resistant mutants of the moss, *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics MGG*, 154(1), 87-95. <https://doi.org/10.1007/BF00265581>
- Bassham, D. C., & Crespo, J. L. (2014). Autophagy in plants and algae. *Frontiers in Plant Science*, 5, 679. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00679>
- Bi, G., Zhao, S., Yao, J., Wang, H., Zhao, M., Sun, Y., Hou, X., Haas, F. B., Varshney, D., Prigge, M., Rensing, S. A., Jiao, Y., Ma, Y., Yan, J., & Dai, J. (2024). Near telomere-to-telomere genome of the model plant *Physcomitrium patens*. *Nature Plants*, 10(2), 327-343. <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01614-7>
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1), 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>
- Casal, J. J., & Balasubramanian, S. (2019). Thermomorphogenesis. *Annual Review of Plant Biology*, 70, 321-346. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095919>
- Castro, A., Saavedra Borelli, L., Ruibal, C., Lascano, H., & Vidal, S. (2020). *Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the Bcl-2 associated athanogene (BAG) gene family in Physcomitrium patens*. <https://doi.org/10.1101/2020.12.23.424083>

- Concordet, J. P., & Haeussler, M. (2018). CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic acids research*, 46(W1), W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gky354>
- Collonnier, C., Epert, A., Mara, K., Maclot, F., Guyon-Debast, A., Charlot, F., White, C., Schaefer, D. G., & Nogu  , F. (2017). CRISPR-Cas9-mediated efficient directed mutagenesis and RAD51-dependent and RAD51-independent gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biotechnology Journal*, 15(1), 122-131. <https://doi.org/10.1111/pbi.12596>
- Craita E. Bit  , & Tom Gerats. (2013). *Frontiers | Plant tolerance to high temperature in a changing environment: Scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops*. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2013.00273/full>
- Deveau, H., Garneau, J. E., & Moineau, S. (2010). CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annual Review of Microbiology*, 64, 475-493. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134123>
- Fort Fossali, S. (2018). *GENERACI  N DE CONSTRUCCIONES G  NICAS PARA LA INACTIVACI  N DIRIGIDA DEL GEN DE LA AGLUTININA DE SOJA MEDIANTE CRISPR/CAS9*.
- Froesch, B. A., Takayama, S., & Reed, J. C. (1998). BAG-1L Protein Enhances Androgen Receptor Function *. *Journal of Biological Chemistry*, 273(19), 11660-11666. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.19.11660>
- Gall, C., Nebel, M., Scholten, T., Thielen, S. M., & Seitz, S. (2024). Water’s path from moss to soil Vol. 2: How soil-moss combinations affect soil water fluxes and soil loss in a temperate forest. *Biologia*. <https://doi.org/10.1007/s11756-024-01666-w>

- Gamerding, M., Carra, S., & Behl, C. (2011). Emerging roles of molecular chaperones and co-chaperones in selective autophagy: Focus on BAG proteins. *Journal of Molecular Medicine*, 89(12), 1175-1182. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0795-6>
- Gazol, A., & Camarero, J. J. (2022). Compound climate events increase tree drought mortality across European forests. *The Science of the total environment*, 816, 151604. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151604>
- Gourdji, S. M., Sibley, A. M., & Lobell, D. B. (2013). Global crop exposure to critical high temperatures in the reproductive period: Historical trends and future projections. *Environmental Research Letters*, 8(2), 024041. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/8/2/024041>
- Grimsley, N. H., Ashton, N. W., & Cove, D. J. (1977). The production of somatic hybrids by protoplast fusion in the moss, *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics MGG*, 154(1), 97-100. <https://doi.org/10.1007/BF00265582>
- Harayama, T., & Riezman, H. (2017). Detection of genome-edited mutant clones by a simple competition-based PCR method. *PLOS ONE*, 12(6), e0179165. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179165>
- Holger Sondermann, Clemens Scheufler, Christine Schneider, & Jörg Höhfeld. (2001). *Structure of a Bag/Hsc70 Complex: Convergent Functional Evolution of Hsp70 Nucleotide Exchange Factors* | *Science*. <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1057268>
- Jakob Zscheischler, Seth Westra, Bart J. J. M. van den Hurk, Sonia I. Seneviratne, & Philip J. Ward. (2018). *Future climate risk from compound events* | *Nature Climate Change*. <https://www.nature.com/articles/s41558-018-0156-3>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.

Science (New York, N.Y.), 337(6096), 816-821.

<https://doi.org/10.1126/science.1225829>

Kabbage, M., & Dickman, M. B. (2008). The BAG proteins: A ubiquitous family of chaperone regulators. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65(9), 1390-1402.

<https://doi.org/10.1007/s00018-008-7535-2>

La Farge, C., Williams, K. H., & England, J. H. (2013). Regeneration of Little Ice Age bryophytes emerging from a polar glacier with implications of totipotency in extreme environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), 9839-9844.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1304199110>

Li, Y., Williams, B., & Dickman, M. (2017). Arabidopsis B-cell lymphoma2 (Bcl-2)-associated athanogene 7 (BAG7)-mediated heat tolerance requires translocation, sumoylation and binding to WRKY29. *New Phytologist*, 214(2), 695-705.

<https://doi.org/10.1111/nph.14388>

Liu, Y., & Bassham, D. C. (2012). Autophagy: Pathways for self-eating in plant cells. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 215-237.

<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105441>

Lobell, D. B., & Gourdji, S. M. (2012). The Influence of Climate Change on Global Crop Productivity. *Plant Physiology*, 160(4), 1686-1697.

<https://doi.org/10.1104/pp.112.208298>

Locascio, A., Marqués, M. C., García-Martínez, G., Corratgé-Faillie, C., Andrés-Colás, N., Rubio, L., Fernández, J. A., Véry, A. A., Mulet, J. M., & Yenush, L. (2019).

BCL2-ASSOCIATED ATHANOGENE4 Regulates the KAT1 Potassium Channel and Controls Stomatal Movement. *Plant physiology*, 181(3), 1277–1294.

<https://doi.org/10.1104/pp.19.00224>

- Mallett, D. R., Chang, M., Cheng, X., & Bezanilla, M. (2019a). Efficient and modular CRISPR-Cas9 vector system for *Physcomitrella patens*. *Plant Direct*, 3(9), e00168. <https://doi.org/10.1002/pld3.168>
- Pettinari, G., Finello, J., Plaza Rojas, M., Liberatore, F., Robert, G., Otaiza-González, S., Velez, P., Theumer, M., Agudelo-Romero, P., Enet, A., González, C., Lascano, R., & Saavedra, L. (2022). Autophagy modulates growth and development in the moss *Physcomitrium patens*. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1052358>
- Proctor, M. C. F., Oliver, M. J., Wood, A. J., Alpert, P., Stark, L. R., Cleavitt, N. L., & Mishler, B. D. (2007). Desiccation-tolerance in bryophytes: A review. *The Bryologist*, 110(4), 595-621. [https://doi.org/10.1639/0007-2745\(2007\)110\[595:DIBAR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1639/0007-2745(2007)110[595:DIBAR]2.0.CO;2)
- Rensing, S. A., Goffinet, B., Meyberg, R., Wu, S.-Z., & Bezanilla, M. (2020). The Moss *Physcomitrium* (*Physcomitrella*) *patens*: A Model Organism for Non-Seed Plants. *The Plant Cell*, 32(5), 1361-1376. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00828>
- Rensing, S. A., Lang, D., Zimmer, A. D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.-F., Lindquist, E. A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin-I, T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S.-I., ... Boore, J. L. (2008). The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5859), 64-69. <https://doi.org/10.1126/science.1150646>
- Rensing, S. A., Rombauts, S., Van de Peer, Y., & Reski, R. (2002). Moss transcriptome and beyond. *Trends in Plant Science*, 7(12), 535-538. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02363-4](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02363-4)
- Rosati, A., Graziano, V., De Laurenzi, V., Pascale, M., & Turco, M. C. (2011). BAG3: A multifaceted protein that regulates major cell pathways. *Cell Death & Disease*, 2(4), e141-e141. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.24>

Sanchez-Vera, V. (2017). *Full article: Autophagy is required for gamete differentiation in the moss Physcomitrella patens.*

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15548627.2017.1366406>

Schaefer, D. (2002). A new moss genetics: Targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annual review of plant biology*, 53, 477-501.

<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135202>

Schaefer, D., Zryd, J. P., Knight, C. D., & Cove, D. J. (1991). Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 226(3), 418-424.

<https://doi.org/10.1007/BF00260654>

Schween, G., Egener, T., Fritzowsky, D., Granado, J., Guitton, M.-C., Hartmann, N., Hohe, A., Holtorf, H., Lang, D., Lucht, J. M., Reinhard, C., Rensing, S. A., Schlink, K.,

Schulte, J., & Reski, R. (2005). Large-scale analysis of 73 329 *physcomitrella* plants transformed with different gene disruption libraries: Production parameters and mutant phenotypes. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 7(3), 228-237.

<https://doi.org/10.1055/s-2005-837692>

Schween, G., Gorr, G., Hohe, A., & Reski, R. (2003). Unique Tissue-Specific Cell Cycle in *Physcomitrella*. *Plant Biology*, 5(1), 50-58. <https://doi.org/10.1055/s-2003-37984>

Strotbek, C., Krinninger, S., & Frank, W. (2013). The moss *Physcomitrella patens*: Methods and tools from cultivation to targeted analysis of gene function. *The International Journal of Developmental Biology*, 57(6-8), 553-564.

<https://doi.org/10.1387/ijdb.130189wf>

Thanthrige, N., Jain, S., Bhowmik, S. D., Ferguson, B. J., Kabbage, M., Mundree, S., & Williams, B. (2020). Centrality of BAGs in Plant PCD, Stress Responses, and Host Defense. *Trends in Plant Science*, 25(11), 1131-1140.

<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.04.012>

- Trogu, S., Ermert, A. L., Stahl, F., Nogu  , F., Gans, T., & Hughes, J. (2021). Multiplex CRISPR-Cas9 mutagenesis of the phytochrome gene family in *Physcomitrium* (*Physcomitrella*) *patens*. *Plant Molecular Biology*, 107(4), 327-336.
<https://doi.org/10.1007/s11103-020-01103-x>
- Wang, J. Y., & Doudna, J. A. (2023). CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning. *Science (New York, N.Y.)*, 379(6629), eadd8643.
<https://doi.org/10.1126/science.add8643>
- Wu, S.-Z., Ryken, S. E., & Bezanilla, M. (2023). CRISPR-Cas9 Genome Editing in the Moss *Physcomitrium* (Formerly *Physcomitrella*) *patens*. *Current Protocols*, 3(4), e725.
<https://doi.org/10.1002/cpz1.725>
- Yi, P., & Goshima, G. (2020). Transient cotransformation of CRISPR/Cas9 and oligonucleotide templates enables efficient editing of target loci in *Physcomitrella patens*. *Plant Biotechnology Journal*, 18(3), 599-601. <https://doi.org/10.1111/pbi.13238>
- Zhou, Y., Yang, K., Cheng, M., Cheng, Y., Li, Y., Ai, G., Bai, T., Xu, R., Duan, W., Peng, H., Li, X., Xia, A., Wang, Y., Jing, M., Dou, D., & Dickman, M. B. (2021). Double-faced role of Bcl-2-associated athanogene 7 in plant–Phytophthora interaction. *Journal of Experimental Botany*, 72(15), 5751-5765. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab252>
- Zimmer, A., Lang, D., Richardt, S., Reski, R., & Rensing, S. (2007). Dating the early evolution of plants: Detection and molecular clock analyses of orthologs. *Molecular genetics and genomics : MGG*, 278, 393-402.
<https://doi.org/10.1007/s00438-007-0257-6>

8. Anexo

Tabla S1. Características de los diez genes de la familia *BAG* identificados en *P. patens*. Tomado y adaptado de Castro et al., (2020).

Proteína	ID	Coordinadas en genoma	Localización subcelular	Marco abierto de lectura (pb)	Propiedades de proteína			Número de intrones
					Largo (aa)	PM (KDa)	PI	
<i>PpBAG1</i>	Pp3c13_3400V3.1	Chr13:1981929..1984334	Núcleo	1959	652	72.8	5.08	0
<i>PpBAG2</i>	Pp3c26_10790V3.1	Chr26:6801591..6804008	Núcleo	1959	652	72.2	4.81	0

<i>PpBAG3</i>	Pp3c4_24420V3.1	Chr04:163788 17..16381129	Núcleo	1926	641	71.3	5.05	0
<i>PpBAG4</i>	Pp3c26_11200V3.1	Chr26:703722 6..7040477	Citoplasma	735	244	26.7	5.71	3
<i>PpBAG5</i>	Pp3c4_23970V3.1	Chr04:161857 31..16189158	Citoplasma	807	268	29.6	5.94	3
<i>PpBAG6</i>	Pp3c21_6840V3.1	Chr21:414130 9..4143658	RE	441	146	16.5	9.34	1
<i>PpBAG7</i>	Pp3c19_7760V3.1	Chr19:471226 0..4716962	Citoplasma	423	140	15.9	9.46	1
<i>PpBAG8</i>	Pp3c19_17670V3.1	Chr19:114599 30..11465454	Núcleo	4452	1483	16.1	4.91	1
<i>PpBAG9</i>	Pp3c7_10910V3.1	Chr07:717152 9..7175575	Mitocondrial	1254	417	46,6	9.39	2
<i>PpBAG10</i>	Pp3c26_2210V3.1	Chr26:104013 2..1043195	RE	630	209	22.9	9.94	3

Tabla S2. Cuantificaciones de ADN realizadas en el fluorómetro Qubit 4.

#	Muestra	[] ng/μL
1	3W1	14.4
2	3W2	2.62
3	3W3	14.1
4	3W4	4.19
5	3W5	6.63
6	3W6	5.06
7	3W7	-
8	3W8	2.96
9	3W9	2.19

10	3W10	35.3
11	3W11	19.1
12	3W12	-
13	3W13	18.4
14	3W14	-
15	3W15	-
16	3W16	-
17	3W17	9.00
18	3W18	19.5
19	3W19	-
20	3W20	9.52
21	3W21	6.55
22	Wt	48.9

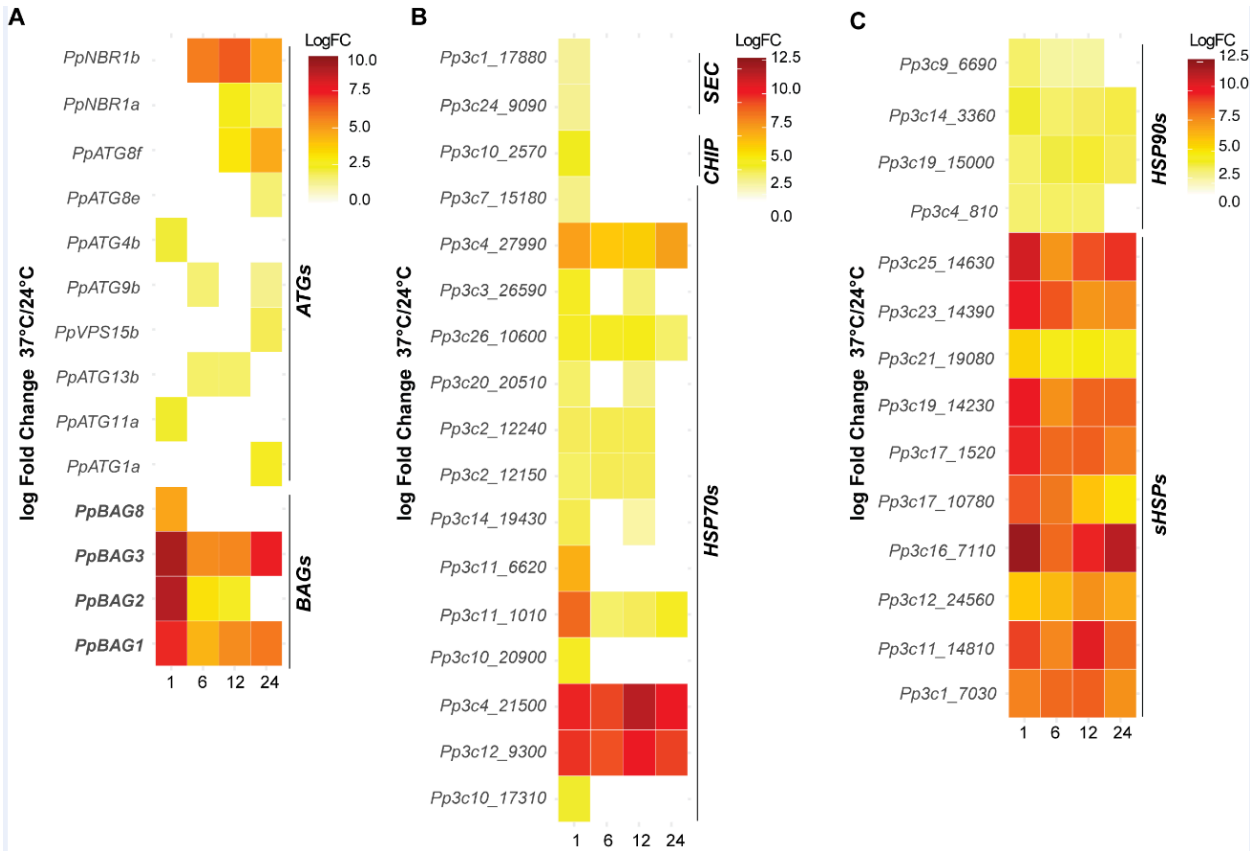


Figura S1. Genes *BAG*, Autophagy (*ATG*), *CHIP SEC*, *HSP70s*, *sHSPs* and *HSP90s* regulados positivamente en protonema de *P. patens* bajo estrés térmico (37°C) comparado en condiciones control (24°C). Valores tomados a 1h, 6h, 12h y 24h. Los datos de expresión fueron seleccionados de un estudio de RNA-Seq realizado por Elzanati, et al (2020). Genes IDs: *PpATG1a* (*Pp3c19_5230*), *PpATG11a* (*Pp3c19_12090*), *PpATG13b* (*Pp3c2_10630*), *PpVPS15b* (*Pp3c9_3860*), *PpATG9b* (*Pp3c2_1820*), *PpATG4b* (*Pp3c7_280*), *PpATG8e* (*Pp3c14_15040*), *PpATG8f* (*Pp3c14_15141*), *PpNBR1a* (*Pp3c7_8990*), *PpNBR1b* (*Pp3c11_16970*). Tomado y adaptado de Castro et al., (2020)

PpBAG1:

AAGCCATTGTGACCATTTGATCCTAACATAGAAACACAGTAATTTCTTCCATCTAAAATTTGTATTAACTAATAACTATTTAATGA
 GACTCTCACACACCGTAGCGTATACAGCTTGCTTATATACGTATCCAGTAGACGACGCTATCAATCCAGGTACGTACACCACCGAT
 GACGAGCGGTAGAGCACACTAGCCGCGATGGATGAGAACTGTCTGTTCCAGAGGCTTCTCGAAGACCATTCCGATATACCCCCC
 CCATCCTTGCTTCCAGACCCCTTCTTCCACGGACACGCCCCGTGTGAGCTGCCAGCCGGCAGTGCCACATCAGCCAGGTCCACC
 TGGTTCCAGACCCCTTCTGTCCGCTTCCACAGCTTCTTTCATCCTGCCACATGAGCGCCATCGCTCATTACAAAATTGTGTCCC
 ACTCGCTCTGTCTCATCAACTCCGCATGTCAACTTGTTCGAGAGCGATCAGGCTTGTAGATTCATTGGAAGGTTCCATTAGCT
 GCCGTAGAAATTTCCGCGAGTGTGTATACGTTGCGCGGTGTAGAGCATCGAGAGTTGTATGATTTTCTCAAGAAGATGTGCAG
 CTGAGTCGGGGTTTTGGGGAGATTTGAATCGGTGACGGAGTTTGTGCGCTATGATTTGGTGCTAGGCGAGGGAGCGAAGTTG
 GCGGGGTTTCATTGTGAGACGTTGTGAGTGAGTGAAGTCGCTTGCATTGGAATCCGGAAGTTGCGACGAGCTGGATCAGCTT
 GGGAGTGGGGCTAATTGGCTAGATGTTGGGTAATCCGGAAATTTTCGGGTGCAGACCCGGGAGTTGAGTTCTTAGGCTCTG
 TGGTAGGGATTAGGTTACAGAATGATGAGAGGAGGATTTTCGATAACATGTGGGATCCTTACAGCGGTGCGTATAGGTATCCTC
 GGGTTCAGCCGAGACCGCGGTACAATCGCCACGAGCTCCCGTTTATAATCAGTACGGTCCTTCGATGGCACCGGAGTACAATT
 TTGCTCCTGTGGTTGAAGAGCCTATGAGTAGAAAGGCAGCTCGGACAATCCCCGTTTCAGATGGAAATGTTCTGTAGCTGTGTC
 GCAGAAAGCTCCGCAAGCAGAGGTTAAGCGAACTGCTGCCACAGGCGAGGCGGGTGGTGTGAGATTTAAGAGTGAGGATA
 CTGCCGCCAAGAAGATTCAGGCCGCGTATCGTGGTTATTCTGTGCGCAAGACTCAGCTCTCTCAAACACCTGAGGGAAATTAAGA
 AGGTCAGGGAAGAGCTCGAGAGTCTTAAGCGGAAGTCCAAAGAGGAAGAAGAGGAGGAAGAGCTGTGTAGTGACCCCCAGGA
 AAGACTGAGGTGGACAGAGGGTATTATGTTGATGTTGCTGCGTTTGGATTCACTACAAGGCGTGCATCCAGAAGTCCGATTATA
 CGCAAGGGGTTGACGAAGGAGTTGCTGGGCTTCCAAGAGATAATCGATTGATGACTGTATCTGGAGAGGCGGAAGGTAAACAA
 GATGATGGCATTTCGGAGAAGCCCGACACTTCTGATACGGTGAAGAAATGGCAATTGATGGTCTCACAGATTTACTAATGCAG
 AAGGTGAAGAGAAAATGGAAGTCGAGGGAAGAATTTCTGATGGATTAAGTGGTGTGAAATGAAGCAAGCGGTACGGTACCT
 TTGAACCCCAACAATCAGTGATGCAAAATATCGAACCTCATGAAGCGAGTGAAGAGGTTGAAATGAAGCCAACAGGATCAACGT
 CACTGAGCATCGAACTCCTGGGAAGCATGTACACCAGGTACATTGCGACGATTCTAATAAAATTGACAATTCAGTTATTAAGAATGC
 TAATGATCAGAGAGAATCCCTTGCTGGAGAGAGCATCATTGAAGGAGTGAATCTGTTTTGAGACCAAGCTCTATTGAGGCTGAT
 GTTGAGGTTCCAATGGCTGTAGAGGAGGCACAAACCTCAGCGCAAACATTAGCAATGGATTCTCTTGCCCCCGCCATGAAAGAT
 GAGCTTGAAACGATGTTCAATTCCTCCCAATCTGTACCATACAGAAATATTGAACGTGTACATCAAGAGCCTTCTTCAGTGGATGA
 CACTGTCACAACGTCGCCTTCAAGTGGCATTACCCTGGAACCAATGTGCAAGGGTCTTTAGTCGCTCCTGCTAATCACAATGAT
 GATGGGAAGCTGTTGGATCCGTTGACGACGTGGATGCAGATAAAGAAGCGGAGAAGCTGCCAGGTGAAGCAGAAAACCTATC
 ACCGAATGAAACGGAAAATGCTATTATGAGGCTAATCCGAGGACTGTGAATCCCTGAAAGGAGAGGGTGTACAGGATCTTCG
 GCTCCAGGTGATGAGTGAAATTGATTCCGCTCATCAATCAATCCATGTCCTAGAAACACAATGTGTCGAGAATTCGGAAGTAG
 GACAGCCACAGGTCTCAACTGCTGACGATGGTACCCCTTGTGAGAAGTGTGAGCTGTTGCTACAGCTGTTGGAGGAAAACCGA
 AAACCTCAAGGATGTTGTCGAAAAGTGTGCAATTGGGGTAAACAGCAGAACGATGTTATTCACAGCTTAGCTACCCGAATTGAAC
 AATTAGAGAGATCTCAACTTCAATCAAACCTGTTGGAAGGAGAAAAATACAAGACCAGGAAAAGAATAAGTAATGATGCATCATATG
 TTGGCGATAGAGACAGACCTCGTCGAAAGGCAGAGAGAGGTGGCAGGAGGAATACCAGGCATCTTAATATGGCAATTTAGAAG
 AATGGCCCTCTGCTGAATCAGATGAATCTTTTAG

PpBAG2:

GTGCCAGGGGAGCTTCGACTCTGGACTGATGCTGAATGTTCTAGAACGTGCTCGAAAGCGCGGGCAACTGCTCTGTTCTAGA
 GACTCCCACTGAAGCTTCGCCGTTTCGCTTACAAGTTGCATGCTTCGCTTTAAATAATTCATAGATCGCTTAGCTTCTCAAGTCT
 GTCACACGCTGTGTAGATTAGCATACTTGAAGTATTCTAAGGGCAGTGGTGAATCGTGAATGGTGAATCGTAGTTGTAAAT
 CCAGTTGAATCTGGAGCGCTTGTGTTTTGATCGAGCTGGTGGTGTCTTCCAGTGAGCTGATTTTTCTGTTTAGTTGCTAATGG
 GTGGAGGATACTTTGATAACATGTGGGATCCCTACAGCAGTTCGTATGTGTATCCTGGGGCGCAGCCGAGGCTGGGCATTACC
 GTCCAAGAGCTCCTGTGAATGATAGTTATGGTTATTCGAGGGTGCAGAGGATTGGACCTATCCGGCTAAGGTCAAGGAAACACC
 GAGCAAGAAGACAGTGAGAATAATTCCTGTTACGGATGGAAGTGCATTGAGGCGGTGGCGCAGGAAGTTGTGCAAGTAGAAGT
 TCCGCTCGTGTGGGAAGTTCGAGAGTGAGACGGCTGCAGCAACGAAGGTGCAGGCTGTGTATCGTGGTTATTGTGTGCGTA
 AGACTAAGCCTTTAAAGCATTGAAATTGATTAGGAAAGTTAAGGAGGAGCTGGAGAATTTTCGAGCTTAGGTTTCAAGAAGTACCG
 CAGAAGAAAAGAATTTGACTGACCCGACAGGAGAGATTGAAGTGGACAGAAGGCATTATGGCATTGCTGCTACGGTTGGATCAAT

TGCAAGGTGCGCATTGCGACGTCCGTCTCGTACGCAAGTCAGTGGCCAAAGAATTGATAAAATTTTCAGGAGAAGCTGGATTCTAT
TTCAGATGCTTCTGAAGATGAGGACTTGAAAGACTCATCCATGGTTGAGGAGAATGGTGATAATCTCGATTTTTTCGAATGAAGGGT
CGAAACTTATTGATAACGGCGAAGATTCTCCCGGTGAAAAAGCGTAAAGGAAATGGGAATTGACAAAAGCATTCCGGAGAGTAT
AGGTGCGTCGGGAGAATTTAGATTATTTGGAGGGAGCAATAAATGAGGATGGTATCAATGTTACCTCAGAGCCCCAACAAAGCAGTG
GACTACGACGGTGCCGTTGAAGCGAAGAACGAGCTACGGGAAAAAGATTCTAACAGCATCAAGGGCATTGAGGATGTAGCATCT
GAGCAGCAGGCACCTGAAGAGCATGTTGCCTCAATTTCTACGAGTCATCATGATCAGGACGGCTTACTTCACAGTTCAATGGGTG
TGATCGTGGATCCCATAGTAAGTGATGGTTTGGATCCGAGCTTGACAGAGCCTTTTGCTGCTTTTCCAATGGATGTAGAAAACGA
GGTTGCAGGGGAGCCGGCTGTGCACTTAGAAGAAAATGTGCAATCTGAGTCACAGTATTTGGAAAGTGTAACACCTATGGATGTT
GAAGGTGGCAATCAGGAATCCTGTCAATTTGAAAAATTTCTGGCAAGCGAACCCTCAAGTGTTGTTGCTGACGAGTCAGCATCA
CAGGAGAGTGATGCAATAGCTTCTGTGCGAGAATGATGTGGTTCACGGCAAGGAACATAACGTGAGGAGAGGAGAAGCAGAGGA
GCCGTGCAATGTACTTGTAAAGCCTGATCTCAGTAGGTTATCATGCTGTGACTCGGGTCTGATAATCTTGACATTTCTAAATGTCT
GGAAGAGAGACAGACTAAGGCTGGATCAGTGGACCTAGACAATCGGTGTATGATTCCCGCAGGTACTTCTCTGATTACTCCTCAG
GCTACTTCTCTGGCACCTCAATGTTGCCAGAGGCTACTACAAGGCCACCCCCAATCTTCAACTGCTGACAATAATGAAGCTTTGT
CTAACCGTGGCTGCTGCAACAACTGCTTGACGAAAATCGAAAATCAAGGATGTAGTTGGGAGAGTATTACATTGGGGCAACGA
ACAGAACGACATTATTACAATTTAGCTAGCCGTATTGAGCACTGGAGGAACCACAATTCCAAGTAGACATTGTACAGGCGGAGA
AGCAATAGGCAGAAAGAGAATTAATACTGATTGATGCGTAGCGGGTGGTGGGAAAAGATCACTTCGTAGGATAGAGAAAGTCTG
CAAGAAGGGAAAATCGGGTAATAGGCTCCAACCTAGTCGCTTCGATCCAGCAAATTGCTCTCTGCGGAATCAGAAGAATATTTT
GA

PpBAG3:

ATGGGAGGAGGACTTTTTGATAGTATGTTGGATCCTTACAGCACTGCGTGCATGTATCCTAGGGCGCAAACGAGGGGTCGGTATT
ATCGGCCAAGGTCTCCTGCGTATGATTATCCTGGTTTTACTGGGATGCCAGAGAATCGCGCTTTTTTCGAGTGAGGTTAAGGAAAC
TCCTGTTGGGAGGGCTGTAAGGACGATTCTGTTACAGATGGAAGTGACCTGTGGCGATGTCGCGAAACGTGGATCGAGTAA
GACGCCGCCTGAGCTTGAGAGGTTTGCAGTAAGGAGCTAGCCGCAAGGAAGATCCAAGCTGTGTACCGTGTTATTCCGTGC
GAAGGACTCAACCTCTGAAACACTTGAGATTGACCATGAAAGTCAAAGAGGAGCTGAAGAAGTTGAAGTTGAAGTTGGAAGGGG
AAGAACAGAGGAAAAAGCTTTGTAGTGACCCGCGAGGAAAGAATTAGGTGGACGGAAGGTGTCATGGCATTGCTATTACGGTTGG
ATCAGCTGCAAGGTGCGCATCCGGATGTCCGAATCATACGTAAGGCAGTAGCAAAAGAACTGATAGCATTACAGGGACAGCTCG
ATTCCCTCTCCGATTCTCTGAAGAGCACAGTGTTGGAGATGCACCTGAAGAGAACATTACCATGCGGGATGCAGCGGGTGAAG
GGACGAAAATATTTTCATGATGACGCAAACATTCTGCTGTAGAAACCACGGAGGGAGTGGAATTCAGAACAACATTTTCGCAGGA
ATTGAATGATTTTGAATAAGAATTTGCACCGACAGTACAGGAAGCAGATGATATCCATTCTGCCCTCGAGGTCAATCAGACTA
AGTATCAGAGTTCTGTATTAGAGGAGGGCAACGAGATGGATGAGAATAATTCTGATGACATCAAGGTCAATGAGAATTTAACACCG
GAGCATCAGTTACCTGTGGAGGTGAGTGCCCTCAGTCGCCGCGAGATTGTCATGAACAAGCTGCTTCCATAGACCAATAGGT
GAGAGCGCAATACAAATGTGGAACGAGTTTTGGAACCATGCTCTTCAGAGACTTCTCTGAGATTTCATTTGGTGAAGGAAATG
AAGAAAGAATGCTGGGTTCAAATCCAGCCCTCGACTTGGCAGAGGGAGATAAGGGAAGTGATTTTCGCACGGAAAAACACATTAC
CGGAGAGGGCTGTCAAATAGACGATGCAGTGGCAAGTGCACCCTGTAAAGATTCTACTGAAGATCCAATCGCAGTCAAGAATGA
GGCAACAGTTCTGTGCGAAGATGATCGCAGCAGTGAGTTGGGTACACCACGAGGAGTGAAGCAGAGAGACCAATGATTGAAG
TTGAAAAGCCAGAGCTCAATACTGCACCAAACCTCTCCGTGGATGGTTTCTATCCTGATGCTCTCATGCGTCTGGAAGGGAGAGA
GGATGATGCAGGACTGCCGGATCTAGGTGGAAGATGGATGATTCAGCAAGTCTTCGAAAACCTCTTGTCTGGAATCGCAATGC
GCTGCGAGTTTGAAGTTGGTCAGTCTCAGTCTCCAACCTGCAGAGAATTGTAATGCTTTGTGCAACCGTGCGCTGCTGCAGCAA
CTGCTCGAGGAGAATCGGAACTGAAGGATGTCGTTGGGCAAGTGTTACACTGGGGGAAGCAACAGAATGATATTATTTACAATT
TAGCTAGCCGGATCGAAAACTGGAGGAACACCGGCCCAAGCAAACATGTTGCATGAGGAGAAAAACAAGGGCAGGAATGGA
AGTAGCACTGAAACATATTTGGCTGGCGATAGGGGAAGATCACTCCCAGGATGGAGAGAAATCGCAGGAAGGAAGGTGAG
GCATCGGTTCCAATTAGGTTACTTAGATCCAGAAAAATTGGCTCTCGGCAGATTCAGACGAATGTTTTGA

PpBAG8:

AAGCCATTGTGACCATTGATCCTAACATAGAAACACAGTAATTTCTTCCATCTAAAATTTGTATTAACTAATAACTATTTAATGA
GACTCTCACACACCGTAGCGTATACAGCTTGCTTATATACGTATCCAGTAGACGACGCTATCAATCCAGGTACGTACACCACCACT
GACGAGCGGTAGAGCACACTAGCCGCGATGGATGAGAAGTGTCTGTTCCAGAGGCTTCTCGAAGACCATTCCGATATACCCCCC
CCATCCTTGCTTCCAGACCCCTTCTTCCACGGACACGCCCCGTGTGAGTGCAGCCGGCAGTGCCACATCAGCCAGGTCCACC
TGGTTCCAGACCCCTTCTGTCCCGCTTCCACAGCTTTCTTTCATCCTGCCACATGAGCGCCATCGCTCATTACAAAATTGTGTCC
ACTCGCTCTGTGTCATCCAACCTCCGCATGTCAACTTGTTGAGAGCGATCAGGCTTGATAGATTCATTGAAAGGTTCCATTAGCT
GCCGTAGAAATTTGCGGAGTGTGTATACGTTGCGCGGTGTTAGAGCATCGAGAGTTGTATGATTTTCTCAAGAAGATGTGCAG
CTGAGTCGGGGTTTTTGGGGAGATTTGAATCGGTGACGGAGTTTGATGCGCTATGATTTGGTGCTAGGCGAGGGAGCGAAGTTG
GCGGGGTTTCATTGTGAGACGTTGTGAGTGAGTGAAGTCGCTTGCAATTTGAATCCGGAAGTTGCGACGCACTGAGTCTGATCAGCTT
GGGAGTGGGGCTAATTTGGTCATAGATTGTTGGGATTCTGGGAAATTTTTCGGGTGCAGACCCGGGATTGAGTTTCTTAGGCTCTG
TGGTAGGGATTAGGTTACAGAATGGCTAGGGCGATGATTGATGATGGCGCAGTGCCTATGCCTTGAGATTGCAATTCACCAAC
CGCCGTATATATGGTTTCGCGCCTGTGTCTCCAATTCCTCAGCACTCTGGAGCCCCGCAATACGTTTACTATCCAATGCTTCC
TCTGGTTATGGCGTTCTGTGTCTAATGCGGTGGCATTACAAGATTATTATACCCGTATCCTGTGTATAATATTCTACCTCCGGATG
CTCGACGTAATGAACTCAGAATGCAGGACGCATGTGAAAATGCTACGAGACAAGAGAAGCAACCGAGGGTTCCAAGAGTTCAGC

CAGTTCCTCAGCAATGGATTACCCCCCGCGCACTTAACCTCTGACGGAGCTATTGTTGGGCAGCCGTTGCAAGTCCATAGATA
 TCCCATGTATCGTGTGGACGATGCACCTGATACGAGTCACTTGCGTTTCAGATCCGAGCGGAATTCAGTTTCGTAATAGTTACGGA
 GTTCCATTGACTCCAAAAATATCTGCTCAGGGGCGAGAGTCTGCCATTGCGATGAGTGGCTCCCAGCCATACATCCTCCCTGCTC
 CCCAACCCGGGATGCAATGGAAGCTGGTGCCGATTGCAGATCCTGACCCCGAGAAATCCCAGGGATGATTCCCAAGGCAATG
 CCGGCAGCGTCAAGGCACCTTTGATGCTCATGGCGTCACCGGGAAGTGAGAATGCCACCAACGATTGTGCCAAGCCGGACTC
 TTCGCCCCCTGAAGCTGAAGATTGGTGACGACGTCCATCCTGCCAAGTCTGAAGATCCGTATAGTCAAATCTTTCACTTCTGTTTC
 CGAAATCGGGAGCAAAACATGAGGTAAGAGAGGACGTAAGGTTGATGGTCCCTCGTCACCAAAAAACAGTGAGTAAATTTGATC
 TGAAGGCTGGGTGAAAAGGAGAAGGTAGAACCTACCATCCCCAAGCTATCAGGATAATTCCTGTAACGGATCCCCAGAAGAG
 AAGTCTGTTGCGGACCCTACGAAAGAGAAATCTGTTGCGGAACCTTCGAAAGAGAAGTCTGTCTCTCAAGTGAAGAAGTGAAG
 AAGTCATCCGCGCCAGTACTCAAACCCATTAAAGCTGGTACCGTCGCTAGATTTTGTAAAGAAGAAAGATAGTAATCATGCAAATGG
 ATTTAAGGAGGAGAAGCAGGTTGCTCCTGGAATCATGCTAAACCTGAATCTCATCAGATACCGTCACATGATCGTGCGAAAAGAG
 GAGGTACCTGCAAGGAAAGCCCCGATGGGGCAGGCACATGAGGCTGCACCGAAGGCGGAGGTGCTAGTGACGAGTGCAAAAG
 AAAAGCCAGTATCACCAGAAAGAGTGACATCTGGAGTGCTGAAAGACATGGAGTGTGACATCGCAGAGCCTCAGGGCGCTAAAA
 AGCATTCTCCCAATGTAAAGGTGGCAATTACTAGTAGCGAGACCGCTGCGAGAGTTATACAATCCGTGTGGAGGGGTCACTTAGT
 GCGACGACATCAACCGTTGAAGCACTTGCGCGATATCGCTCGTGTAAAGCTCATGTTAAAGATTACCAGACTCTCTTGGTGGAC
 AAAACGAGTTTCTGAAGAAGTGTGTAGATCCAGTGGAGAGGAACAAAATTTCCGAAGGACTCATGAGCTTGTATTGCAACTTG
 ATAGCATACAGGGAGTTGATCCAGTTGTTAGAGACATTCGCAAGTATACTTCCAAGGAAGTTTGAAGTTGCAAGCGAGGTGGA
 TGCTGCTACTCAAGTTGTCATCGACAAGGCTGACCATGTGTCAACTGAATTGAGCATGCTAGCAAAAAGTACTGATGTGGCCAAC
 AACGATTTTGTGTAAATCAGGAGTCCAATTCAGCAGAACCAAGTCATAATGTTGATTGTGCGGATGCTCCCGTGAGCAATGGCG
 AGGAAATGGTGATGACTAGGTGAGAGGAACTGAGAACAAGATTCACCTTTCAGAGCCGATTGAGATTTGTAAAGATAGAGACGC
 TCTTGTAGTGATGACACGGGAATGGTGATCAATGAGCGGAGTGAAACTGCGTGCGAGACTCAACCTATCGTCCCACAAAACAT
 ACAGGTCAAACAGAGAGCGTGTAGGGGACCTACTACGAAAGCTTTTGAATAGGCTACCCGATTTTGAAGTACCAGGAACCC
 GAGACAGTGAATAAAAGGGAGACCTTGATAGATGCAGATGATTTGACACTGATATCTGAGGTGGTGAAGAGGCTCTCTGTTTTAG
 AGGAGCAGCGAAGTATCGACACAGAGAAAAACAGCTCAACGAACGTGAATTGCCCCCTCAGCTCCTTGCTCCGGGACTTCTTT
 ACAAGGGAGAAGAACTGATAATGTCAGACACTAGTTCTTCTGCAACTTTAGTGGCGAAGGTCTTCACTCGAACATTTCCGTTGG
 GGTGGAACCTCACTGGAGAAAGTGGCAAATCAAGCGACGCTTCGGGTAAAGAAGACAAATTGCTCATTCTGAACCTGCAACATC
 TCCAAGCGAATCGGAGCTCCATAACTTGAGGAAGGGCACCTCGGATGACCCGGATGCGGCAATAAATATTTAGATGACATGATG
 AACCCAGCGCAATCTACACCAGATGAGGAGAGTGGTGGGGGTCAAATGCTCAAACCATCAATGCCACGATTTTGCAAGAAAAAT
 TAGGTGTTGGGAACGGTTCACTTCTTAAACCAATGAATCTGGATGCAATCGCTGATGTGACGGAAATTCGCCATTGTGTATTGTT
 GGAGACCAGGAGGATATTGAGAGAGAAACAAAACGAGATAATGATGAAGAGTCACCAGCAGTGCGCAATTCGCGGAATCTGGT
 ATCTTACCTAGAGAAGCTGATCCGAATTCATCGGCCGGAACAGTGACACAGACATTCTGGAAGAGATGTTGCAATTCGACCTG
 AATTCGAAGGAGAGGAACTTCGTTATCTTGCATTCAAATCAGTGTGAGACTGATAACCAGAGCAATACGTCCTGTCCAGAACAC
 AAGTTTGGGAGCAATGAACCTGTGAGACACGAAAGTAACGGAGACATCAAACAGATCAAGTATCTGCTTTGGTATTTTCGGAAG
 AGAGTAATGAAAATAATGTGGCAGTTGATGATGAGGCTTCTGATAATGCAACAGGTCTCGATTCAACTACATCCTTTGTTAATGAGG
 TTTTTGGCGTGCCAGAGGGAGAATCGACGATTGATGGAGCCCCACAGCAACTTACGACAGCAGATGGTGTGCTCGGGTACCC
 AATGTTGAAACGTTTGATTATCCCAAAAAGGGCAGTTGTCGTTAAATGAAGAGAATGAGAAGGACAACAAGACTGAGGATGACA
 TTGATATAGAGAATGGTCCGCAGTTAAGTGTGGCTGCTTTCGCTGACGCGGAGCATTGGGTATTCCATGTAATGATTCTTCATCA
 TCGCAGAACTCACTTGATGGTATCAGCAGGTACGATCGGGTATAGAGGTAATTCGGTGGTAGGATCAAATCTTTTGGAGGAG
 TGTTGAGTCGGGCACCTCTGAGTCGGAACCACAAATGGGTGTCGCAAAATCCTCTGACCAGTCTGTGGTACCAGAGAGCGTC
 GATGTAACCTGAGGGAGTGAACGTTCAAACCTCAGATAAGTGCCTCACACCTGAGAAGAAAATAACTGAGACTAACAGTCCAACCT
 CAATCTTGGATACTGCAAATGCTCTGCATTCTGTGGAACCTTATATTACTGAGAGCACCACCGACATTGTGCGGGACGAATCTACT
 TCCGAGATGCCTTCAATTGTGGCTACCATGGCGATGCAAGAGTCAACTCAAATTTCTCCTTCATCTATAGAAGATTTGCAGCAAGA
 ATCGACTATTTCCCATCTCCAAAGCCCTAACCTTGAAGAACAAGTTTCCGTCACTGACCAATTAACACAATTAGAGTCTGCAATCT
 CCGATCTCCAGAACCTCAACAATAGAGGTCAAGGATACCTCGACAACCTCAATCCTGCAGAGGAGCTGCGGGATGCGAGATCGT
 CGATGTCTTCTCATTCTCCACATCAAAGAGAATCGCAGAGGATATTACATTCCCAATCCAATCTCATTGAGTGCAGGCGCTCTA
 CATGTTCTGAGAGGCTCGGCATATCGTATGGACGAATCTGAAAATCACAGCCTAACCAACCAATTCTCCATCATCAGATTCTGAAAG
 TTCACAAAAAATCTCACGCAGCACTTGATCGAAGAAAATACAATATTGAAAGCAGTCTTCGAGATGTTCTAAAGTGGAGTCAGT
 GGCAAAGCTCGGCAACGATGCGTCTTCACAAAATGATCGAGAACCCTGAACACAAAAATCCCCAGTAGCCGACACACTCCGAAGA
 GGAGGGTTAAGACTGCTAAATTATGCGGATTGCCGAAACGAAAATATGAACCTTTGA

Figura S2. Secuencias de los genes *PpBAG1*, *PpBAG2*, *PpBAG3* y *PpBAG8*. En color verde la región UTR, en azul la región codificante. Resaltado en amarillo los cebadores *forward*, *probe* y *reverse* para el ensayo de PCR de competencia, subrayada la región de hibridación del ARN guía, y en color rojo la secuencia PAM. Para *PpBAG8* la región codificante se muestra en dos tonos de azul, correspondientes a los dos exones.

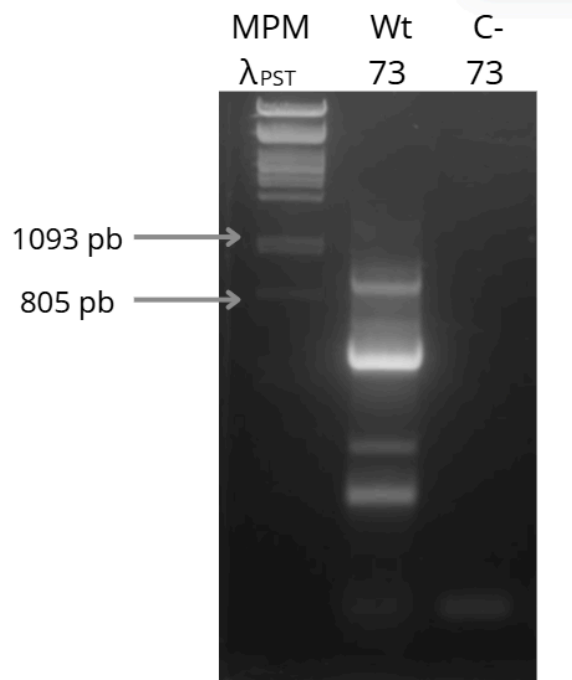


Figura S3. Electroforesis en gel de agarosa 2% para el análisis de los productos de la PCR de competencia para el gen *PpBAG2*. El carril MPM corresponde al marcador de peso molecular de 50 pares de bases. En el carril Wt, correspondiente al control no editado, se esperaban dos bandas: una banda mayoritaria de menor tamaño (218 pb) y una banda secundaria de mayor tamaño (548 pb), aunque se observaron un mayor número de bandas. El carril C- corresponde a un control negativo con el guía 73, donde no se observaron amplificaciones.