



Sección de Biología
Universidad de La Laguna

**Revisión del uso de la edición génica mediante
CRISPR-Cas9 en hongos. Proyecto para su uso en el
hongo *Botrytis cinerea*.**

**Review of the use of gene editing using CRISPR-Cas9
in fungi. Project for its use in the fungus *Botrytis
cinerea*.**

Trabajo de Fin de Grado

SARA DOBLE MIR

Tutorizado por Celedonio González Díaz y Nélida Brito Alayón

Grado en Biología. Junio 2020

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	1
Introducción.....	2
Objetivos	3
Sistema CRISPR-Cas	4
Mecanismo natural del sistema CRISPR-Cas.....	4
Aplicación de CRISPR-Cas en edición genética.....	6
CRISPR-Cas en hongos.	9
CRISPR-Cas en hongos e investigación básica	10
CRISPR-Cas en hongos y aplicación en la industria alimentaria.....	12
CRISPR-Cas en hongos y producción de fármacos	13
CRISPR-Cas en hongos e investigación sanitaria	14
CRISPR-Cas en hongos y aplicaciones fitosanitarias.....	15
CRISPR-Cas en hongos y prevención de plagas.....	16
CRISPR-Cas en hongos y biodegradación	17
Aplicación de CRISPR-Cas en <i>Botrytis cinerea</i>	18
Importancia de <i>Botrytis cinerea</i>	18
Diseño experimental: CRISPR-Cas en <i>Botrytis cinerea</i>	19
Expresión de Cas9.....	19
Estudio del efecto de la expresión de Cas9.....	22
Diseño y expresión del sgRNA	23
Introducción del molde para la reparación.....	24
Comprobación del funcionamiento de CRISPR-Cas	25
Aportaciones de la aplicación de CRISPR-Cas en <i>Botrytis cinerea</i>	25
Conclusiones.....	26
Conclusions	26
Bibliografía.....	27

Resumen

El sistema CRISPR se descubrió como un mecanismo de inmunidad adaptativa en bacterias, pero ha demostrado ser de gran utilidad como método de edición genética, ya que permite generar cortes de doble hebra en el genoma de forma dirigida. La edición genética se aprovecha de la reparación de este corte por los sistemas de reparación de la célula en cuestión, que puede ser usada para la introducción de las modificaciones deseadas en el genoma.

Dado que los hongos tienen gran impacto en la vida humana, CRISPR-Cas se ha empleado en distintas especies de éstos, lo que implica importantes avances en la edición genética de dichos organismos. En este trabajo se explica el funcionamiento CRISPR-Cas y se proporcionan ejemplos de experimentos en los que se ha empleado este sistema en varias especies fúngicas. Así, se pueden apreciar algunas de las aportaciones que esta técnica ha proporcionado al estudio y aprovechamiento de los hongos. Completamos este trabajo con un diseño experimental planteado para el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, con el fin de ejemplificar cómo se aplicaría CRISPR-Cas de manera empírica.

Palabras clave: *Botrytis cinerea*, CRISPR-Cas, hongo, edición genética.

Abstract

The CRISPR system was discovered as an adaptive immunity mechanism in bacteria, but it has proven to be very useful as a gene editing tool, as it allows the generation of double-strand breaks in the genome in a targeted way. Gene editing takes advantage of the repair of this cut by the cell's repair systems, which can be used to introduce the desired modifications in the genome.

Since fungi have a great impact on human life, CRISPR-Cas has been used in different fungal species, which implies important advances in the genetic editing of these organisms. This work explains the functioning of CRISPR-Cas and provides examples of experiments in which this system has been used in various fungal species. Thus, some of the contributions that this technique has provided to the study and exploitation of fungi can be appreciated. We complete this work with an experimental design proposed for the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*, in order to exemplify how CRISPR-Cas could be applied empirically.

Keywords: *Botrytis cinerea*, CRISPR-Cas, fungus, genome editing.

Introducción

A finales de 2018, se dio a conocer que un grupo de científicos chinos aseguraban haber creado los primeros bebés modificados genéticamente, usando la técnica de edición genética conocida como CRISPR-Cas, con el fin de protegerlos frente al virus del sida (Vidal Lij, 2018). Aunque esta modificación acabó con el principal responsable del proyecto en la cárcel (Wee, 2019), esta y otras aplicaciones dan la impresión de que ha empezado a desarrollarse un nuevo mundo en el marco de la Biología y la Genética. Sin embargo, este sistema de edición de genes y el mecanismo de defensa bacteriano en el que se basa se conoce desde años antes.

En 1987 se encontró el primer indicio de su existencia, al descubrirse una secuencia de DNA que se repetía de forma inusual en el genoma de *Escherichia coli* (Ishino, Shinagawa, Makino, Amemura, y Nakamura, 1987). En 1993, Francisco Martínez Mojica (Mojica y Montoliu, 2016) describió secuencias similares en el archa *Haloferax mediterranei*, y en los siguientes años, se siguen describiendo estas secuencias repetitivas en distintas bacterias y archeas. En el año 2000, Mojica las denomina SRSRs (*short regularly spaced repeats*) (Lander, 2016); y dos años más tarde, este nombre se modifica al actual: CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*; traducido: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) (Jansen, Van Embden, Gaastra, y Schouls, 2002).

En un primer momento, se consideró que estas secuencias repetitivas carecían de función, pero en 2005 se identifica este sistema como un mecanismo de defensa adaptativo y heredable de las bacterias frente a los virus (Yoshizumi Ishino, Krupovic, y Forterre, 2018).

Aunque estos descubrimientos sentaron las bases para el desarrollo de la técnica de edición genética, no fue hasta 2012 cuando se llevó a cabo el primer “corte” de material genético con el sistema CRISPR-Cas (Jinek *et al.*, 2012). A partir de este momento, se comienza a intuir que dicho procedimiento podría emplearse también en otro tipo de células y, por tanto, usarse como una herramienta de edición genética en el laboratorio.

Hoy en día, el sistema CRISPR-Cas se puede usar para modificar los genomas con múltiples finalidades: regular la expresión génica, etiquetar sitios específicos del genoma en células vivas, identificar y modificar funciones de genes, o corregir genes defectuosos,

entre otras. El sistema permite hacer todo esto de manera rápida, fácil, barata y, sobre todo, muy precisa. (Hsu, Lander, y Zhang, 2014).

Además, las mejoras en el sistema CRISPR-Cas no dejan de aparecer. Así, se ha desarrollado una modificación del sistema que muestra mayor eficiencia y menor tasa de cambios no deseados que el propio CRISPR-Cas original (Anzalone *et al.*, 2019). La técnica, bautizada como *prime editing* (“edición de calidad”), llega como una mejora que, según afirman Anzalone *et al.* (2019), podría llegar a corregir cerca del 89% de enfermedades humanas asociadas a diferentes variantes genéticas, enriqueciendo enormemente el área de edición genómica.

En este trabajo me voy a centrar en el uso del sistema CRISPR-Cas en hongos, ya que son organismos ubicuos que impactan sobre la vida humana de manera positiva y negativa. Por ejemplo, los hongos sirven como una fuente importante de enzimas industrialmente relevantes, y juegan un papel crucial en la recirculación de biomasa en los ecosistemas, ya que son capaces de degradar materia orgánica (Deng, Gao, Liao, y Cai, 2017). Por otro lado, entre los hongos filamentosos hay patógenos de animales y plantas, tales como *Botrytis cinerea*, causante de la podredumbre ácida o podredumbre gris en una amplia variedad de plantas en regiones templadas de todo el mundo (Muñoz, 2008); o el género *Aspergillus*, un hongo oportunista capaz de provocar patologías pulmonares invasivas en inmunodeprimidos (Díaz Sánchez y López Viña, 2004).

Objetivos

El objetivo general de este trabajo es **revisar el uso de CRISPR-Cas como método de edición genética en hongos, y describir la manera en que este sistema se podría usar en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*.**

Para alcanzar este objetivo, he realizado una revisión bibliográfica del funcionamiento del sistema CRISPR-Cas, de cómo puede emplearse en edición genética, y, fundamentalmente, de las publicaciones sobre la aplicación de dicha técnica en hongos. Asimismo, he revisado las herramientas moleculares disponibles en *B. cinerea* para plantear un diseño experimental de CRISPR-Cas aplicado a dicha especie. Así, además de mostrar una visión global del funcionamiento de CRISPR-Cas en hongos, quiero aportar un ejemplo concreto de cómo podría emplearse la técnica en un hongo de interés.

Sistema CRISPR-Cas

Debido a su enorme potencial para aplicaciones en ciencias básicas, medicina y biotecnología, se han investigado numerosas vías para llevar a cabo la edición de genes. Una manera posible de modificar el genoma es conceptualmente simple: generar una rotura del DNA de doble hebra en el sitio del genoma que queremos modificar, y luego permitir que esa rotura se repare, mediante recombinación homóloga (HR), con una molécula de DNA exógena que contenga la modificación que queremos introducir en ese sitio del genoma. Se han diseñado distintas metodologías de este tipo, entre las que destacan los sistemas ZFN (nucleasas dedo de zinc) o los TALEN (nucleasas efectoras con actividad similar a los activadores de la transcripción) (Gaj, Gersbach, y Barbas, 2013). Sin embargo, es el sistema CRISPR-Cas el que ha suscitado mayor interés.

Mecanismo natural del sistema CRISPR-Cas

Los sistemas CRISPR, observados por primera vez en bacterias, son una clase de sistemas inmunes adaptativos que utilizan pequeños RNA CRISPR (crRNA) y nucleasas Cas para detectar y destruir ácidos nucleicos extraños (Hatoum-Aslan, 2018). El crRNA es el encargado de dirigir a Cas hacia su secuencia complementaria, donde realiza un corte (Lammoglia-Cobo *et al.*, 2016). Aunque se han identificado tres tipos de sistemas, todos ellos se basan en una serie de elementos que tienen que estar presentes (Fig. 1): los espaciadores, adquiridos de virus o diferentes materiales genéticos detectados como perjudiciales; elementos repetitivos que separan entre sí a las secuencias espaciadoras; la secuencia líder o promotora, situada hacia el extremo 5'; y los genes Cas. Esta simplicidad hace que el sistema CRISPR-Cas sea el más conveniente para la edición génica en el laboratorio, al poder llevar a cabo una edición genética dirigida a un sitio concreto del genoma de manera sencilla (Lino, Harper, Carney, y Timlin, 2018).

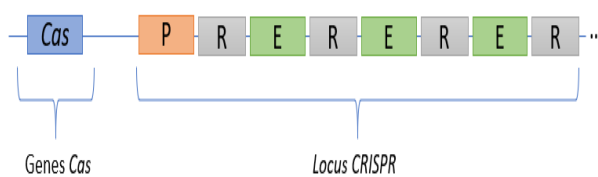


Fig. 1. Elementos del sistema CRISPR: genes Cas, secuencia promotora (P), elementos repetitivos (R) y elementos espaciadores (E). Las secuencias espaciadoras son las provenientes de materiales genéticos extraños, y se encuentran flanqueadas por las secuencias repetitivas.

La inmunidad adaptativa mediante CRISPR se consigue al introducir pequeñas secuencias de DNA exógeno en el locus CRISPR (regiones E en Fig.1), generando así un

registro de infecciones, y cortando luego cualquier DNA de la célula que contenga esas regiones E, es decir, cortando el DNA exógeno. Esto ocurre en tres fases (Fig.2):

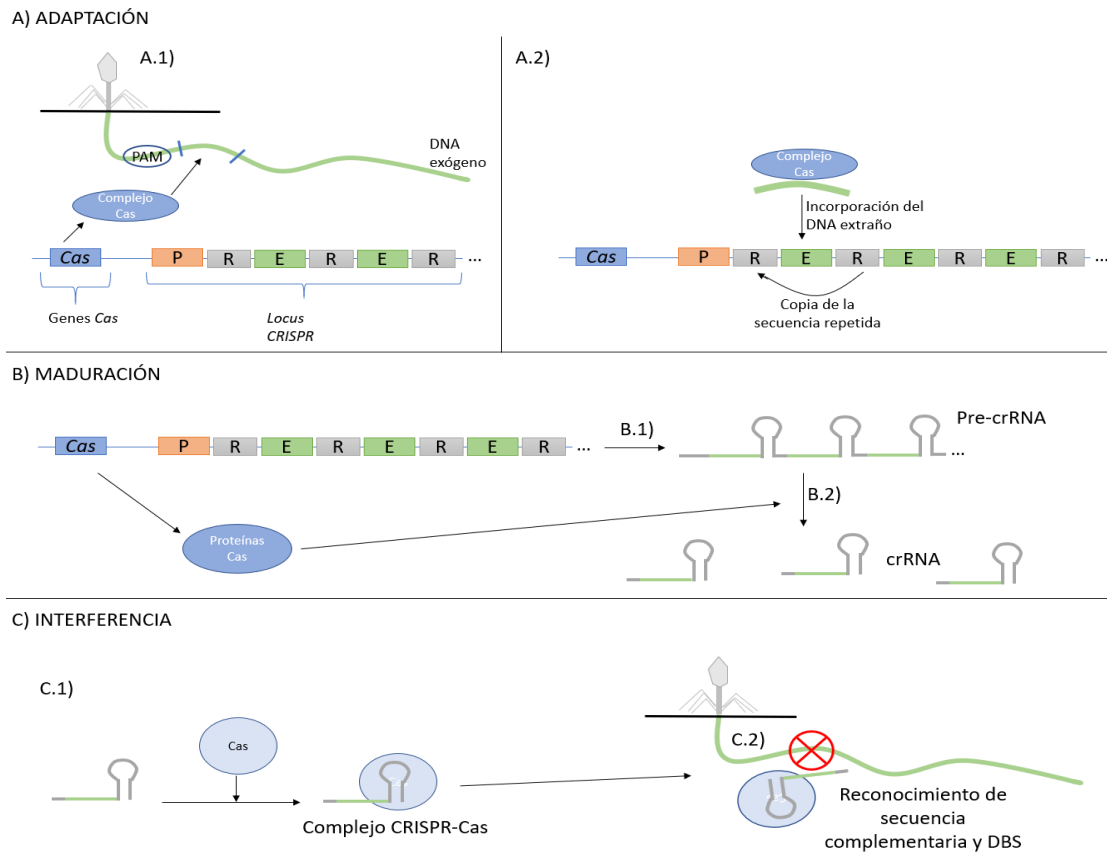


Fig. 2. Fases del proceso de inmunidad adaptativa mediante CRISPR. Durante la adaptación (A), el sistema reconoce el motivo PAM (A1) en el DNA extraño y, con la participación de proteínas Cas, incorpora una secuencia adyacente a PAM como elemento espaciador en el locus CRISPR, que quedaría flanqueado por elementos repetitivos gracias a que se produce una copia de estos (A2). En la maduración (B) se transcribe el locus CRISPR, formando un pre-crRNA (B1), que es escindido en los varios crRNAs (B2). En la fase de interferencia (C), se forma el complejo CRISPR-Cas (C1), que reconoce la secuencia complementaria al crRNA en el DNA exógeno y produce un DSB (*Double Strand Break*) (C2).

En la primera de ellas (Fig. 2A), la ‘adaptación’, se produce la adquisición de secuencias espaciadoras tras la exposición al patógeno (ya sea material genético de un virus o un plásmido). Una vez que el DNA extraño está en el citoplasma, la célula reconoce una secuencia de dicho DNA, conocida como motivo adyacente de protoespaciador (PAM), e incorpora los nucleótidos adyacentes al PAM, con la participación de proteínas Cas, en el locus CRISPR. El DNA extraño se incorpora como secuencia E a continuación de la secuencia promotora (P en Fig. 1). Durante este proceso, se genera una copia de la secuencia repetitiva de CRISPR (R en Fig. 1), de modo que cada elemento E que se incorpora queda flanqueado por elementos R (Doudna y Charpentier, 2014).

En la segunda etapa (Fig. 2B), maduración, se produce la transcripción del crRNA. Las regiones E, junto con las regiones R, se expresan en forma de un transcrito de RNA primario (pre-crRNA o crRNA precursor) portador de todos los espaciadores del locus. Este precursor es cortado luego por endonucleasas de la familia Cas en fragmentos más pequeños (crRNAs maduros), conteniendo cada uno de ellos, un espaciador y su respectiva repetición (López Mancheño, 2015).

Finalmente, en la fase de interferencia (Fig. 2C), la endonucleasa Cas se asocia con uno de los crRNA maduros y forma el complejo CRISPR-Cas. El crRNA guía entonces al complejo hacia su DNA diana por medio del reconocimiento de la secuencia complementaria (Lammoglia-Cobo *et al.*, 2016), y se produce entonces el corte de ambas hebras del DNA por acción de Cas, generando un corte de doble hebra (DSB: *Double Strand Break*), permitiendo así el silenciamiento génico del agente invasivo.

Como ya se ha mencionado, existen tres tipos de sistemas CRISPR-Cas (I–III) (Karginov y Hannon, 2010), siendo el de tipo II el que tiene mayor interés para la edición génica. El sistema tipo II tiene una serie de peculiaridades que lo hacen más interesante. En los sistemas I y III, la degradación de los ácidos nucleicos la lleva a cabo un complejo formado por varias proteínas, mientras que en el tipo II solo es necesaria una proteína, Cas9, lo que hace más fácil su uso en el laboratorio. Además, el proceso de maduración del pre-crRNA difiere en el tipo II: requiere de la participación de otra molécula de RNA pequeña (denominada tra-crRNA) que presenta complementariedad parcial de bases con el pre-crRNA. El tra-crRNA forma un dúplex con el pre-crRNA. Una vez haya madurado el pre-crRNA, cada uno de los crRNA va a permanecer unido al correspondiente tra-crRNA, y ambos se asociarán con Cas9, formando un complejo ternario que reconocerá y eliminará las secuencias de DNA foráneo complementarias (Serrano, 2014).

Cuándo este tipo de sistemas se adaptan para la edición génica en el laboratorio, los DSBs así generados deben ser reparados por uno de los dos mecanismos de reparación conocidos: unión de extremos no homólogos (NHEJ: *Non-Homologous End Joining*) o reparación dirigida por homología (HDR: *Homology Directed Repair*)(Lino *et al.*, 2018).

Aplicación de CRISPR-Cas en edición génica

Como hemos visto, CRISPR-Cas es un sistema de inmunidad adaptativa en bacterias, que puede aplicarse como método de edición génica. Jinek *et al.* (2012), diseñaron en el

laboratorio una secuencia de RNA guía que, igual que ocurre en el sistema natural, dirigía Cas9 a una secuencia específica del DNA, donde producía un DSB. Para optimizar el método, el RNA guía empleado consiste en una fusión del crRNA y el tra-crRNA, consiguiéndose así una única molécula capaz de guiar a Cas9 para que corte su DNA diana: el RNA guía simple (sgRNA). Este estudio sentó las bases de la edición genética mediada por CRISPR-Cas al demostrar que, mediante el diseño de sgRNAs, se puede dirigir el sistema CRISPR-Cas para generar DSBs en secuencias específicas del genoma.

El empleo de sgRNA es el más utilizado en edición genética basada en CRISPR-Cas, ya que con una única molécula de RNA se puede programar una escisión, mediada por Cas9, en una localización concreta del genoma. La molécula de sgRNA contiene una secuencia de 80 nucleótidos a la que se une Cas9, y otra de unos 20 nucleótidos, complementarios al DNA diana, que permite el reconocimiento de éste. De este modo, para diseñar distintos sgRNAs que promuevan DSBs en diferentes regiones del genoma, habría que modificar los 20 nucleótidos complementarios al DNA diana, y tener en cuenta que este debe estar próximo a una secuencia PAM para que el sistema funcione correctamente. Esto último es necesario puesto que el complejo Cas9-sgRNA reconoce el DNA diana no sólo por la complementariedad de bases entre el sgRNA y el DNA, sino también a través de interacciones de Cas9 con el PAM (Jinek *et al.*, 2012; Wang, La Russa, y Qi, 2016).

Para completar la edición genética, tras generarse un DSB deberán actuar los mecanismos de reparación ya mencionados: NHEJ o HDR. NHEJ da lugar a inserciones o deleciones aleatorias, lo que puede llevar a silenciamiento génico. Por su parte, HDR permite introducir secuencias en un lugar concreto del genoma mediante el uso de otro DNA como molde, o plantilla, para la reparación. Ello lo convierte en un sistema mucho más versátil que puede emplearse para la corrección de genes, la introducción de mutaciones concretas o la introducción de otros genes o secuencias de interés (Musunuru, 2017; Wang *et al.*, 2016). Por lo tanto, el sistema CRISPR-Cas y la posterior reparación mediante NHEJ o HDR permite el silenciamiento génico, la deleción de genes, corrección de genes, incorporación de genes de interés, o cualquier otro tipo de modificación que sea posible introducir en la plantilla de reparación (Lino *et al.*, 2018)(Fig.3A).

Y aún se puede ir más allá en las aplicaciones de este sistema. Por ejemplo, se pueden introducir distintos sgRNAs a la vez, produciéndose DSBs en distintas zonas del genoma (Fig.3A). Esto permite eliminar los fragmentos de DNA (parte de un gen, un gen completo

o un fragmento de cromosoma) (Musunuru, 2017); también facilita la translocación, por lo que es útil para llevar a cabo reordenamientos en el genoma (Wang *et al.*, 2016).

Otras técnicas que emplean CRISPR-Cas son la interferencia mediada por CRISPR (CRISPRi) y la activación mediada por CRISPR (CRISPRa). Estas técnicas no buscan alterar el genoma, sino la represión o activación de la transcripción de un gen. Se basan en el empleo de una molécula de Cas9 con su actividad nucleasa desactivada (dCas9). dCas9 puede fusionarse con represores o activadores transcripcionales, y al llegar al DNA diana -guiada por sgRNA- no produce una escisión, pero si se une a él colocando los represores/activadores en el sitio adecuado. En CRISPRi se busca conseguir el silenciamiento de determinados genes, por lo que se emplea dCas9 unida a represores (Fig.3B), mientras que CRISPRa persigue aumentar la expresión génica, por lo que hace uso de dCas9 asociada a activadores (Wang *et al.*, 2016) (Fig. 3C).

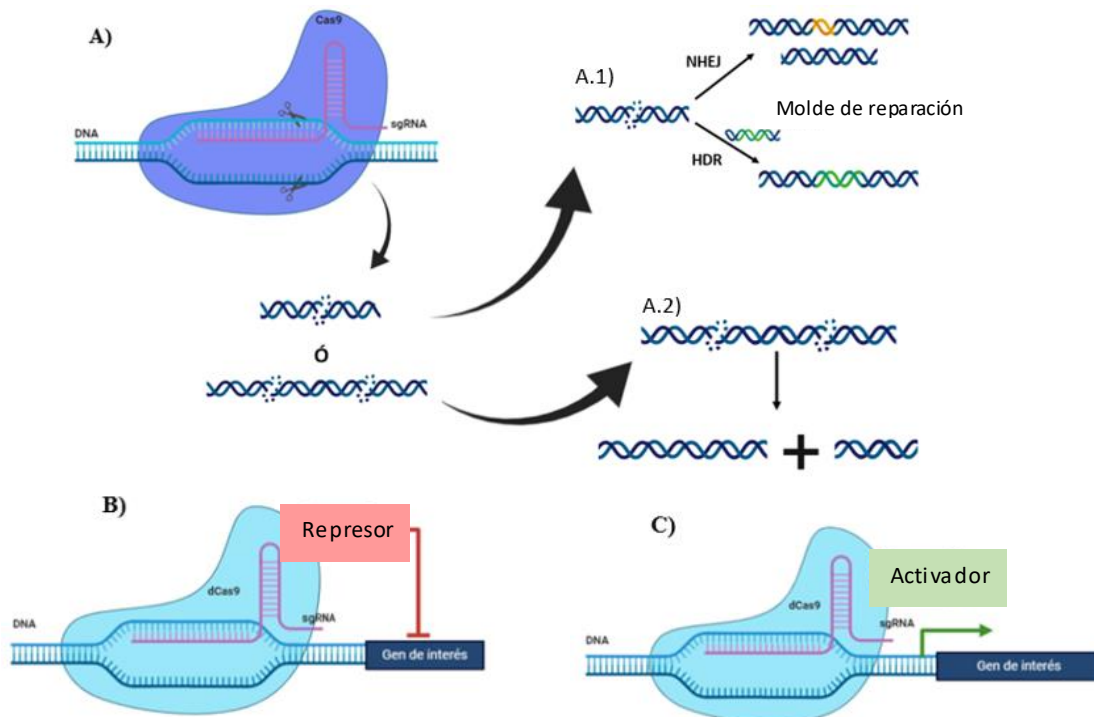


Fig. 3. Aplicaciones de CRISPR-Cas. A) Edición génica. Es posible promover con Cas9 el corte de un solo sitio en el genoma, o en dos sitios. En el primer caso (A1) la reparación del corte puede ocurrir mediante NHEJ, que podría dar lugar a silenciamiento génico a través de inserciones o deleciones aleatorias, o mediante HDR si se introduce en la célula una plantilla de reparación, lo que permitiría introducir en el genoma una nueva secuencia para modificar genes, introducir mutaciones puntuales, etc. En el segundo caso (transformación con dos sgRNAs) pueden darse dos cortes del DNA (A2), por lo que puede eliminarse una secuencia de DNA e incluso llevar a cabo translocaciones. B,C) También puede emplearse dCas9, sin actividad nucleasa, fusionada a represores o activadores, para disminuir la expresión o silenciar genes mediante CRISPRi (B), o para aumentar la expresión de genes mediante CRISPRa (C). (Imagen generada con BioRender.com)

CRISPR-Cas en hongos.

Los hongos tienen importancia capital en la investigación, la industria, la agricultura y la medicina, por lo que el ser humano tiene gran interés en comprender sus mecanismos moleculares. La investigación en hongos se centra en dos objetivos básicos: conocer los mecanismos de patogénesis (en el caso de hongos patógenos y parásitos), y mejorar la aplicabilidad de los hongos empleados en la industria, con el fin de conseguir un mayor rendimiento. Para estos fines, se han empleado múltiples técnicas de manipulación genética, como la transformación por protoplastos, biobalística o electroporación, el silenciamiento génico mediante RNA de interferencia (iRNA) o el uso de ZFN y TALENs (Jiang *et al.*, 2013).

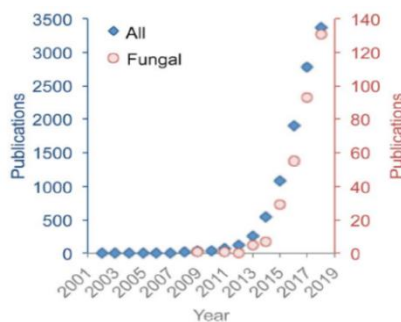


Fig. 4. Gráfica de publicaciones en Pub Med en las que se emplea CRISPR-Cas. Se observa un crecimiento exponencial en el uso de la técnica en hongos (rojo) y en general (azul) (imagen obtenida de Idnurm y Meyer, 2018).

En este trabajo analizaremos una técnica novedosa, CRISPR-Cas, para la manipulación genética en hongos. La utilización de CRISPR-Cas es cada vez mayor en Biología, e igualmente, el empleo de esta técnica en el estudio de hongos está creciendo de manera exponencial (Idnurm y Meyer, 2018) (Fig.4). Esto es debido a las ventajas que aporta CRISPR-Cas con respecto a otros métodos. El mayor obstáculo en la edición genética en hongos es que presentan tasas de HR muy bajas, lo que dificulta la incorporación de DNA exógeno en su genoma. Mediante CRISPR-Cas, al producirse DSBs, se mejora considerablemente la eficiencia de la alteración génica con el uso de HR. Otro impedimento para el estudio de la función genética es la falta de precisión de las técnicas existentes, lo que dificultaba la modificación de genes concretos. Este problema se ha visto resuelto mediante técnicas que permiten el reconocimiento de secuencias específicas en el genoma. Lo ventajoso de CRISPR-Cas con respecto a otros sistemas que también permiten generar DSBs en lugares concretos es que CRISPR-Cas es un método más sencillo y rápido. Únicamente requiere de Cas9 y un sgRNA. Además, CRISPR-Cas permite la edición de varios genes de manera simultánea, y permite llevar a cabo prácticas de edición genética muy variadas que incluyen silenciamiento génico, inserción de

nuevos genes o regulación génica, entre otras (Araoz y Mizutani, 2020; Shi *et al.*, 2017).

En este apartado se exponen distintas aplicaciones prácticas del uso de CRISPR-Cas en hongos, con ejemplos de las especies que se han utilizado en distintas investigaciones.

CRISPR-Cas en hongos e investigación básica

CRISPR-Cas permite grandes avances en la investigación básica y el estudio de las vías metabólicas. Permite obtener de manera sencilla mutantes en los que un determinado gen no es funcional, y así estudiar su función y los procesos en los que está involucrado el gen estudiado. Realmente, el uso de CRISPR-Cas en hongos dentro de la investigación básica sirve de base para poder extender esta técnica a otros propósitos, ya que necesitamos conocer el funcionamiento de la técnica y la Biología del hongo para poder obtener metabolitos secundarios útiles, comprender la patogenia (en el caso de organismos patógenos), potenciar determinadas actividades fúngicas, etc. La mayoría de investigaciones fúngicas que emplean CRISPR-Cas se centran en comprobar que la técnica es aplicable a la especie estudiada y en las implicaciones que tienen mutaciones concretas en la Biología del hongo. Aquí expongo algunos ejemplos de investigaciones en las que se comprueba el funcionamiento de CRISPR-Cas y se ve cómo su uso puede ayudar a entender la función de genes y la fisiología fúngica.

Cabe destacar que el primer organismo eucariota manipulado mediante CRISPR-Cas fue la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Dicarlo *et al.*, 2013; Idnurm y Meyer, 2018). En este primer estudio se utilizó una cepa de *S. cerevisiae* que expresa Cas9 (VL6-48), y se introdujo mediante electroporación un sgRNA dirigido a *CAN1*, que codifica para una permeasa de arginina. De este modo, se pretendía producir mutaciones en dicho gen, por lo que la permeasa no sería funcional, y no permitiría el transporte de arginina o análogos de ésta. Al seleccionar las colonias en un medio con canavanina (análogo tóxico de la arginina), gran parte de las colonias en las que se había inducido mutagénesis sobrevivían, lo que indica que no les afectaba la canavanina, por lo que no expresaban una proteína *CAN1* funcional, demostrándose que CRISPR-Cas funcionaba en *S. cerevisiae*. En esta misma investigación se probó la modificación del genoma con CRISPR-Cas ayudada por HDR, introduciendo DNA donante que incluía un gen de resistencia a G418 y brazos homólogos a *CAN1* (para que se pudiese dar HDR). En medios con canavanina y G418 se observa que la mayoría de colonias resistentes a canavanina lo son también a G418,

demostrándose que se da HDR. Además, la tasa de HR aumenta con respecto a la HR sin corte previo mediado por CRISPR-Cas (Dicarlo *et al.*, 2013). Esta investigación abrió paso al resto de estudios sobre CRISPR-Cas en levaduras, y de manera más general, en hongos.

Nødvig *et al.* (2015) describieron una metodología de CRISPR-Cas que aplicaron a distintas especies. Dicha metodología consiste en el empleo de un solo plásmido que permite la expresión de todos los componentes del sistema CRISPR-Cas, ya que contiene los genes que codifican para Cas9 y los que codifican para el sgRNA. Además, el plásmido incluye otras secuencias importantes, como una secuencia de localización nuclear (SV40), que guía a Cas9 al núcleo; un marcador fúngico (AFUM_pyrG, AN_argB, bleR o hygR); y la secuencia AMA1, que favorece la replicación. Primeramente, comprobaron el método en *Aspergillus nidulans*, afectando al gen *yA*, de modo que los conidias modificados tenían un color amarillento en lugar de verdoso. También probaron la técnica en *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. luchuensis* y *A. brasiliensis*, demostrando que CRISPR-Cas es útil para la edición precisa de genes, aunque el porcentaje de mutagénesis varíe entre las distintas especies.

CRISPR-Cas se ha usado también en hongos superiores. Se ha probado por ejemplo en *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma lingzhi*, al producirse la interrupción del gen *ura3*. *Ura3* codifica una descarboxilasa que produce un compuesto tóxico a partir de ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), de manera que los mutantes eran resistentes a 5-FOA, lo que los hace fácilmente seleccionables. Para el uso de CRISPR-Cas, en primer lugar, se expresó una versión del gen de Cas9 con los codones optimizados para este hongo, al que además se añadió la señal de localización nuclear (NLS) SV40, el promotor constitutivo P_{gdp}, el terminador T_{pdC} y un marcador selectivo (*sdhB* mutado, que proporciona resistencia a carboxina). Posteriormente, se llevó a cabo la transcripción *in vitro* del sgRNA dirigido a *ura3*, para usarlo en la transformación de las células que ya expresaban Cas9. El resultado es la aparición de inserciones y deleciones que producen la interrupción del gen diana, por lo que se produce DSB y NEHJ, demostrándose así el funcionamiento de CRISPR-Cas en las especies estudiadas. Esto es importante debido a que, a pesar de que la eficiencia con la que se produjeron los mutantes no fue demasiado alta, no se ha conseguido la interrupción de estos genes en *Ganoderma sp.* mediante otras tecnologías como HR tradicional (Qin, Xiao, Zou, Zhou, y Zhong, 2017).

Así, podemos observar que CRISPR-Cas puede ser empleado en gran variedad de hongos

(desde levaduras hasta hongos filamentosos, incluyendo hongos superiores) y permite la generación de mutantes de manera más rápida y eficiente que con los métodos tradicionales.

CRISPR-Cas en hongos y aplicación en la industria alimentaria

Los hongos en la industria alimentaria pueden traer grandes beneficios, pero también pueden ser perjudiciales. Por una parte, existen gran cantidad de hongos comestibles, y otros que se emplean en la industria alimenticia en procesos como la fermentación de pan, vino, queso, miso, tempeh, etc. Sin embargo, hay hongos (como *Aspergillus sp.* o *Fusarium sp.*) que producen sustancias tóxicas capaces de contaminar alimentos y cultivos (Gray y Hesseltine, 1970; Shi *et al.*, 2017).

Como ya se ha mencionado anteriormente, *S. cerevisiae*, la levadura empleada en la elaboración de cerveza, vino o pan, fue el primer organismo eucariota manipulado mediante CRISPR-Cas (Dicarlo *et al.*, 2013). Igualmente se ha probado la técnica en hongos filamentosos usados en alimentación, como *Aspergillus oryzae*, empleado especialmente en fermentaciones en cocina japonesa. En este caso, en primer lugar, se expresa Cas9, para lo cual se emplea un plásmido que contiene, además del gen que codifica Cas9, la NLS SV40 (formando parte de la proteína), un promotor, un terminador, y un marcador de selección. Se diseñaron distintos sgRNAs dirigidos a genes que afectan a la pigmentación o fácilmente diferenciables, y se los transfeció en las células que ya contenían Cas9. El resultado fue la aparición de inserciones o deleciones en los genes de interés, demostrando que se puede aplicar CRISPR-Cas en *A. oryzae* (Katayama *et al.*, 2016).

También se comercializan hongos comestibles modificados mediante CRISPR-Cas. Es el caso del champiñón común, *Agaricus bisporus*, en el que se ha empleado CRISPR-Cas dirigido a uno de los seis genes de la familia polifenol oxidasas (PPOs), implicados en el pardeamiento enzimático. De este modo se consigue disminuir un 30% la actividad enzimática, evitando así el oscurecimiento del hongo (Waltz, 2016).

Además de todo esto, como veremos más adelante, CRISPR-Cas también contribuye a la mejora de la industria alimentaria al estudiar los organismos que pueden causar estragos en alimentos y cultivos.

CRISPR-Cas en hongos y producción de fármacos

Los hongos son una fuente importante de metabolitos secundarios farmacológicamente activos, incluyendo antibióticos ampliamente usados (como cefalosporinas y penicilina), antifúngicos (como griseoflavinina o equinocandinas) o compuestos capaces de disminuir el colesterol. Por ejemplo, hongos como *Aspergillus terreus*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium chrysogenum* o *Tolypocladium inflatum* producen metabolitos con efecto en la reducción de colesterol, antibióticos o inmunosupresores (Kück, Bloemendal, y Teichert, 2014; Satish, Shamili, Muthubharathi, y Antony, 2020). Ya se ha empleado la ingeniería genética con el fin de obtener una mayor producción de este tipo de compuestos, y el uso de CRISPR-Cas en hongos parece una buena herramienta para una mayor eficiencia en las modificaciones del genoma que persiguen una producción más eficiente de fármacos.

Penicillium chrysogenum es un hongo filamentoso que, junto con otros metabolitos útiles en la industria alimentaria y agrícola, produce antibióticos β -lactámicos. Aunque el hongo es conocido por su papel en la síntesis de penicilina, mediante edición genética también puede producir otros fármacos, como pravastatina (una estatina, un grupo de fármacos que inhiben la síntesis endógena de colesterol) (McLean *et al.*, 2015). Pohl *et al.* (2016) probaron diferentes metodologías para el empleo del sistema CRISPR-Cas en *P. chrysogenum*: 1) emplearon ribonucleoproteínas (RNPs), administrando a protoplastos un complejo ribonucleoprotéico conteniendo Cas9 y sgRNA que ha sido previamente sintetizado *in vitro*; 2) probaron también la expresión *in vivo* de Cas9 y sgRNA; y 3) probaron además la expresión *in vivo* de Cas9 con la posterior transfección del sgRNA. A pesar de que cada técnica tiene sus ventajas y sus inconvenientes, todas ellas fueron efectivas en esta especie, consiguiendo resultados que dan pie a continuar la investigación en *P. chrysogenum* con el fin de obtener mayor rendimiento en la producción de fármacos.

También tienen mucho interés en la actualidad las llamadas “factorías celulares” a partir de hongos filamentosos o levaduras que quizás en condiciones naturales no producen fármacos. Por ejemplo, mediante métodos basados en CRISPR-Cas se han conseguido cepas de *S. cerevisiae* que producen naringerina, que tiene actividad antioxidante y antiinflamatoria (Vanegas, Lehka, y Mortensen, 2017).

CRISPR-Cas en hongos e investigación sanitaria

Es importante conocer el metabolismo, la patogenia y los genes implicados en la virulencia de los hongos patógenos con el fin de desarrollar estrategias para que causen los mínimos daños en el ser humano. Para el estudio de hongos patógenos suelen emplearse mutagénesis y análisis de mutantes, por lo que la tecnología CRISPR-Cas es un método muy útil para este tipo de investigaciones. Se ha usado el sistema CRISPR-Cas en hongos patógenos como *Aspergillus fumigatus*, que es la especie de *Aspergillus* que más frecuentemente causa enfermedad en individuos inmunocomprometidos (Askew, 2008; Fuller, Chen, Loros, y Dunlap, 2015). En 2015 se usó el sistema CRISPR-Cas dirigido al gen *pksP*,

implicado en la producción de melanina y crucial en la virulencia del hongo. Las colonias silvestres eran verdosas, mientras que las mutantes eran albinas, demostrándose así que no se producían melanina y por lo tanto que el sistema CRISPR-Cas funciona en esta especie. Así se probó que los mutantes de *A. fumigatus* generados con CRISPR-Cas pueden ser empleados para estudios de patogénesis (Fuller *et al.*, 2015). Más adelante se ha seguido empleando CRISPR-Cas en *A. fumigatus*. Umeyama *et al.* (2018) comprobaron, haciendo uso de esta técnica, el papel de *Cyp51A* en la resistencia a azoles. Introdujeron RNPs con dos sgRNAs diferentes, para conseguir un doble corte en el gen *Cyp51A*, y usaron diferentes plantillas de reparación para generar diferentes cepas tras la reparación de los cortes, las cuales deberían contener distintas mutaciones del gen *Cyp51A* (Fig. 5). De este modo demostraron que una de las mutaciones generadas, la mutación Gly138Ser, disminuía la susceptibilidad a azoles.

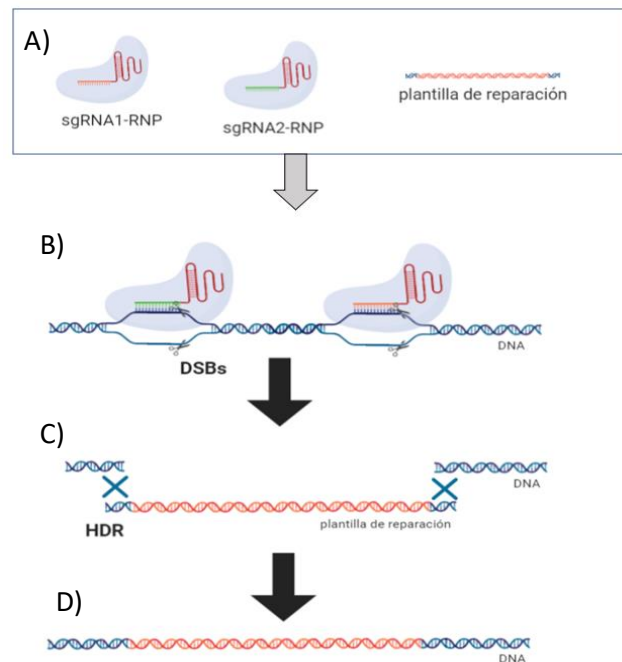


Fig. 5. Esquema del empleo de CRISPR-Cas en *A. fumigatus*. A) Se introducen dos sgRNA-RNPs dirigidos a distintas zonas del gen *Cyp51A* y una plantilla de reparación que incluye el gen *Cyp51A* mutado. B) Cas9 produce dos DSBs, dirigida por los sgRNAs. C) Se produce HDR gracias a los brazos homólogos de la plantilla de reparación. D) El gen *Cyp51A* mutado queda integrado en el genoma. (imagen modificada de Umeyama *et al.*, 2018. Creada en BioRender. com)

Román *et al.* (2019) emplearon CRISPR-Cas para la ingeniería genética en *Candida albicans*, un hongo que normalmente es inofensivo en humanos pero que puede causar enfermedades graves en pacientes inmunodeprimidos. Estos autores usaron este sistema para alterar la regulación (represión y activación) de la transcripción de determinados genes, para lo cual, emplean las técnicas CRISPRi y CRISPRa. Para ello, además del sgRNA, se diseñan vectores que expresen dCas9 fusionada con el activador Gal4 (para conseguir activación de la transcripción) y con el represor Nrg1 (para conseguir represión). De este modo, se consiguió modificar la regulación genética del gen *CAT1* (que codifica la catalasa citosólica), y la mayor o menor expresión del gen podía observarse en base a la sensibilidad al peróxido de hidrógeno.

CRISPR-Cas en hongos y aplicaciones fitosanitarias

Muchas enfermedades en plantas son causadas por hongos patógenos, que alteran el crecimiento y la productividad de los cultivos (Satish *et al.*, 2020). La ingeniería genética es la herramienta más potente para el desarrollo de cultivos resistentes a patógenos, y se puede emplear además para estudiar los hongos causantes de estos daños, para poder conocer mejor su Biología y desarrollar estrategias para actuar frente a ellos.

Por ejemplo, mediante CRISPR-Cas se caracterizó la proteína LmCBP1 de *Leptosphaeria maculans* (un hongo que produce la enfermedad de las patas negras en brasicáceas). Dicha proteína actúa como factor de patogenicidad, y esto se pudo saber gracias al silenciamiento de *LmCBP1* mediante CRISPR-Cas. Para expresar Cas9 y el sgRNA se llevó a cabo la transformación mediada por *Agrobacterium*. Tras la comprobación, mediante secuenciación, de que el sistema funcionó mutando el gen, se inoculó el hongo en plántulas de *Brassica napus* para comprobar la patogenicidad. Las cepas de *L. maculans* mutantes producían menos lesiones y menos muerte celular que la cepa silvestre, demostrándose que LmCBP1 está implicada en la patogenia mediante muerte celular. Además, los mutantes *LmCBP1* fueron más sensibles a H₂O₂. El H₂O₂ es una especie reactiva de oxígeno que puede ser producida por la planta como compuesto antifúngico, por lo que LmCBP1 también contribuiría a la virulencia aportando resistencia a H₂O₂ (Liu, Selin, Zou, y Dilantha Fernando, 2020).

Como vemos, CRISPR-Cas es una vía de investigación interesante en el ámbito fitosanitario, ya que hay gran cantidad de hongos que pueden causar daños en especies

vegetales, como *Magnaporthe oryzae*, *Puccinia sp.*, *Fusarium graminearum* o *Botrytis cinerea* (Dean *et al.*, 2012). Hablaremos detalladamente de esta última especie en el apartado 5.

CRISPR-Cas en hongos y prevención de plagas

Los hongos entomopatógenos son una herramienta biológica frente a las plagas, tanto de insectos que afectan a la agricultura como de artrópodos que actúan como vectores de enfermedades humanas. Los agentes fúngicos de control de plagas más usados son los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*. Estos hongos ofrecen ventajas frente a los insecticidas químicos, y la ingeniería genética permite aumentar su virulencia y tolerancia al estrés para así poder tener mayor impacto en la eliminación de plagas (Chen *et al.*, 2017).

El sistema CRISPR-Cas ha sido empleado tanto en *Metarhizium anisopliae* (Campos de Olivera, 2016) como en *Beauveria bassiana* (Chen *et al.*, 2017). Explicaremos el caso de *Beauveria bassiana*. Para aplicar este sistema de edición génica, en primer lugar se expresó Cas9 en el hongo, asegurándose de que esta expresión no afectaba al crecimiento y virulencia del hongo. Posteriormente se empleó el sistema CRISPR-Cas para introducir una mutación en el gen *ura5*. Se decidió mutar este gen porque sintetiza un compuesto tóxico a partir de ácido 5-fluororótico (5-FOA), lo que hace que los mutantes *ura5* pueden ser seleccionados positivamente en un medio con 5-FOA. En un primer momento no se probó la HDR, por lo que para asegurarse de que el corte había sido llevado a cabo por Cas9 en el loci deseado, se hizo una comprobación mediante PCR y secuenciación de la zona mutada, en la que se determina que se habían generado inserciones o deleciones cercanas al sitio de corte. Posteriormente se probó la eficiencia del sistema HDR. Se usó la cepa Bbcas9^{Aura5}, que expresa el marcador fluorescente eGFP. Se propuso como gen diana *eGFP* ya que esto permite que las cepas en las que se ha producido la mutación sean fácilmente distinguibles (no serán fluorescentes) y se diseñó un donador de DNA con una homología de 250 pares de bases (pb). Se observó que desapareció la fluorescencia y que se incorporó el DNA con la secuencia homóloga, por lo que, mediante esta técnica, 250 pb parecen suficientes para la integración del DNA exógeno en el gen deseado (Chen *et al.*, 2017). Esto es un paso importante que permite avanzar en el estudio de las funciones de los genes esenciales para la relación entre insecto y hongo, y perfeccionar la ingeniería genética para conseguir una mejora en micoinsecticidas.

CRISPR-Cas en hongos y biodegradación

Los hongos tienen un papel importante en biodegradación, y CRISPR-Cas puede permitir un aumento de la producción de enzimas degradativas, con el fin de obtener una mejor degradación y mayor rentabilidad de los residuos (Deng *et al.*, 2017). Hay varios ejemplos de investigaciones que usan el sistema CRISPR-Cas en hongos demostrando que es útil para conseguir una mayor expresión de enzimas degradativas.

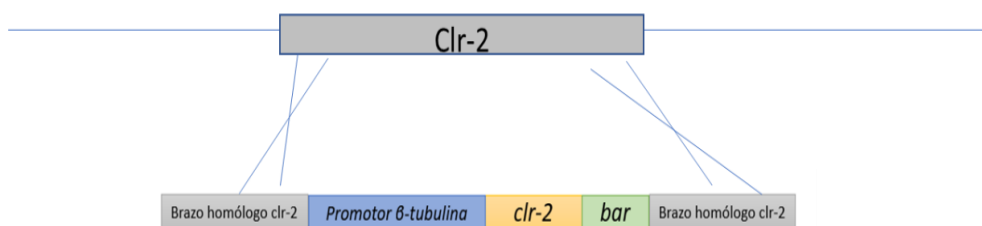


Fig.6. Molde para la reparación empleada en *Neurospora crassa*. Incluye regiones homólogas al gen de interés (*clr-2*), el promotor de β -*tubulina*, *clr-2*, y el marcador de selección *bar*. Tras producirse el corte en el gen *clr-2* se produce HDR.

Matsu-ura *et al.* (2015) emplearon CRISPR-Cas en *Neurospora crassa* para reemplazar el promotor endógeno de *clr-2* por el promotor de β -*tubulina*. Para ello, transfectaron conjuntamente Cas9 y un sgRNA dirigido a *clr-2* para expresar el sistema CRISPR-Cas. También se transforma un molde de DNA para la de reparación (fig.6), que incluye: brazos homólogos al DNA genómico, el gen *clr-2* precedido del promotor de β -*tubulina*, y un marcador de que confiere resistencia (*bar*). De este modo, se consiguió una expresión del mRNA correspondiente a *clr-2* doscientas veces mayor que en cepas silvestres. La proteína CLR-2 es uno de los factores de transcripción centrales que regulan la expresión de celulasas, de modo que *clr-2* bajo el promotor de β -*tubulina* permite una mayor expresión de celulasas.

Otro ejemplo es *Myceliophthora thermophila*. Esta especie produce enzimas termoestables importantes para la degradación de la biomasa. Liu *et al.* (2017) produjeron mediante CRISPR-Cas la mutación simultánea de cuatro genes relacionados con la producción de lignocelulasas (*cre-1*, *res-1*, *gh1-1* y *alp-1*). El resultado fue un aumento en la secreción de proteínas y una actividad lignocelulasa 13 veces mayor. En este caso, al querer mutar varios genes simultáneamente, tras generarse protoplastos que ya expresaban Cas9, se llevó a cabo la co-transformación con los distintos sgRNAs.

Aplicación de CRISPR-Cas en *Botrytis cinerea*

Importancia de *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno que causa la enfermedad del “moho gris” o “podredumbre gris” en más de 1400 especies de plantas (Elad, Vivier, y Fillinger, 2016). El hongo produce la aparición de una mancha marrón o amarillenta que en unos días se recubre de un moho pulverulento y grisáceo (Fig.7). Esta enfermedad afecta a cultivos como vid, tomate, fresa o plantas ornamentales entre otros, por lo que lleva a importantes pérdidas económicas en jardinería y en agricultura, tanto antes como después de la recolección. Por su presencia en todo el mundo y las grandes pérdidas económicas que causa se considera el segundo hongo fitopatógeno más importante (Dean *et al.*, 2012).

Se sabe que *B. cinerea* secreta enzimas, metabolitos fitotóxicos y proteínas no enzimáticas que afectan a los distintos tejidos vegetales, pero no se conoce con exactitud la manera en que el hongo causa la muerte de las células vegetales del hospedador (González, Brito, y Sharon, 2016).

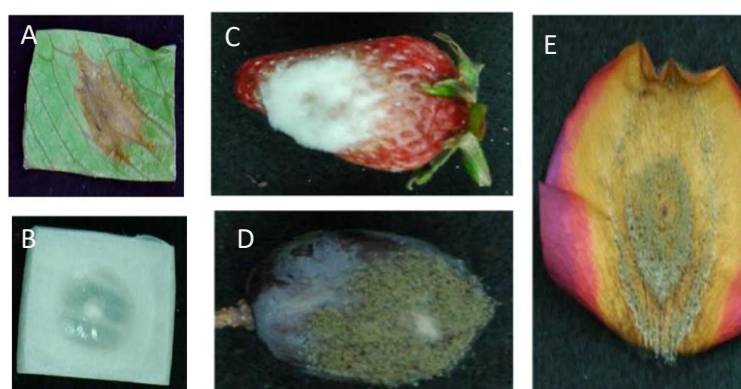


Fig. 7. Tejidos vegetales afectadas por *Botrytis cinerea*. A) Lechuga (*Lactuca sativa*). B) Cebolla (*Allium cepa*). C) Fresa (*Fragaria sp.*). D) Uva (*Vitis vinifera*). E) Pétalo de rosa (*Rosa sp.*). (Imagen obtenida de Wang *et al.*, 2016)

Con respecto al control de este hongo, se ha basado sobre todo en el uso de fungicidas químicos, aunque están apareciendo alternativas no químicas que tratan de evitar los problemas ambientales que podrían darse por el uso excesivo de productos fungicidas, destacando el empleo de agentes de biocontrol tales como *Gliocladium roseum*, un parásito que no es patógeno para la planta (Benito, Arranz, y Eslava, 2000; Chaves y Wang, 2004). Además de todo esto, cabe destacar la existencia de plantas resistentes a hongos patógenos, incluido *B. cinerea* (Polturak *et al.*, 2017). De hecho, para conseguir plantas resistentes a algunas infecciones fúngicas también se ha empleado el sistema CRISPR-Cas en distintas especies como *Solanum lycopersicum*, *Triticum aestivum*, *Vitis vinifera* o *Theobroma cacao* (Satish *et al.*, 2020).

De todos modos, para controlar la enfermedad se requiere un conocimiento previo de los mecanismos de virulencia del hongo. En este sentido puede resultar muy útil el empleo de CRISPR-Cas en *B. cinerea*. Por esto, se plantea el uso de esta técnica para estudiar los elementos que participan en cada fase de la patogenia, con el fin de actuar frente a este hongo fitopatógeno mediante estrategias duraderas y respetuosas con el medio ambiente.

Diseño experimental: CRISPR-Cas en *Botrytis cinerea*

Como hemos visto, CRISPR-Cas se ha aplicado en diversos hongos para obtener beneficios a distintos niveles. En este apartado, se propone un diseño experimental basado en la metodología que se ha empleado en otras especies fúngicas y teniendo en cuenta las características propias de *B. cinerea*. Proponemos la creación de una cepa que exprese Cas9. Posteriormente, se puede transformar dicha cepa con un sgRNA e incorporar un DNA donante que sirva como molde para la reparación mediante HDR. Estas dos secuencias a introducir se generarían *in vitro*, y presentarían secuencias que permitirán la selección de las cepas en las que ha funcionado el método. A continuación, se exponen detalladamente los pasos a seguir para poner a punto el uso de CRISPR-Cas en *B. cinerea*.

Expresión de Cas9

Para el funcionamiento de CRISPR-Cas es necesaria la expresión de la nucleasa Cas9 y del sgRNA. Para que estas dos moléculas se expresen hay diversas metodologías, pero de forma simplificada podemos hablar de tres formas de expresión del sistema CRISPR-Cas (Fig. 8):

- a) Transformación con complejos RNPs Cas9-sgRNA. Experimentos como los llevados a cabo por Umeyama *et al.* (2018) o Pohl *et al.* (2016) han empleado RNPs para conseguir aplicar el sistema CRISPR-Cas en hongos. Con esta metodología se expresa el complejo Cas9-sgRNA *in vitro*, para posteriormente incorporarlo en la célula en cuestión. Esta técnica ha sido recientemente probada en *B. cinerea* de manera exitosa (Leisen *et al.*, 2020).
- b) Expresión *in vivo* de Cas9 y sgRNA. Pueden transformarse Cas9 y sgRNA por separado (Katayama *et al.*, 2016) o mediante un único plásmido que exprese tanto Cas9 como el sgRNA (Liu *et al.*, 2020; Nødvig *et al.*, 2015). El mayor problema de esta técnica lo encontramos en la transcripción del sgRNA, debido a que al no tener cola poliA ni Cap5', no puede transcribirse por la RNA polimerasa II. Por ello, tiene que ser transcrito por la RNA polimerasa III, siendo necesario el uso de promotores

como SNR52 o algunos promotores de snRNA, destacando los promotores U6 (Nødvig *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2017). Otra opción para poner solución a este problema consiste en incorporar el sgRNA en una secuencia más amplia que pueda ser transcrita por la ARN polimerasa II. Dicho transcrito contiene secuencias que codifican para dos ribozimas que permiten que el sgRNA sea liberado del resto de la secuencia de RNA (Nødvig *et al.*, 2015).

- c) Expresión *in vivo* de Cas9 e *in vitro* del sgRNA. En esta técnica se obtienen cepas que expresan Cas9 mediante transformación. Por otro lado, se expresa *in vitro* el sgRNA, que será posteriormente integrado en la cepa que ya expresan Cas9. Este es el método que queremos emplear en este diseño experimental, por lo que a continuación se explica más detalladamente.

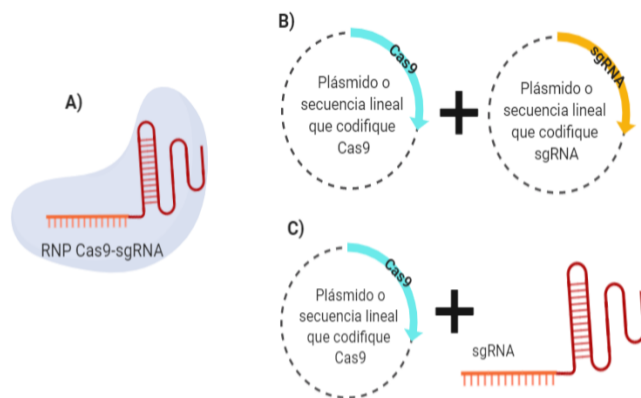


Fig. 8. Formas de expresar el sistema CRISPR-Cas. Se puede: A) expresar *in vitro* un complejo RNP Cas9-sgRNA y transferirlo a la célula; B) transformar la célula con DNA que contenga los genes que codifican para Cas9 y para sgRNA, que se expresarán *in vivo*; o C) transformar la célula con DNA que permita la expresión de Cas9 e introducir posteriormente el sgRNA transcrito *in vitro*. (Imagen creada con BioRender.com)

Lo primero que habría que hacer para conseguir aplicar CRISPR-Cas de este modo es obtener una cepa de *B. cinerea* que exprese Cas9. Para ello optamos por integrar un fragmento de DNA lineal que permita la expresión de Cas9, y también que permita la selección de aquellas colonias en las que el DNA se ha integrado en el genoma. Usamos DNA lineal en lugar de plásmidos circulares porque tiene mejores resultados en *B. cinerea* (Noda, Brito, Espino, y González, 2007). Para conseguir este DNA lineal, generamos un plásmido que contenga el fragmento de DNA que nos interesa y que pueda amplificarse en *Escherichia coli*. Posteriormente, obtenemos el fragmento del plásmido que nos interesa, mediante el corte con enzimas de restricción o PCR, y finalmente empleamos éste para transformar *B. cinerea*.

Para generar el plásmido, vamos a obtener y ensamblar los distintos fragmentos que queremos introducir en el genoma (el gen Cas9 y un gen que permita la selección) y los elementos necesarios para que se amplifique en *E. coli*.

Para que Cas9 se exprese en *B. cinerea* es necesario optimizarlo, empleando un promotor y un terminador que sean útiles en la especie y una NLS para que la endonucleasa se exprese a nivel nuclear. Empleamos el promotor *oliC* y el terminador *trpC* de *A. nidulans*, que ya han sido previamente empleados en *B. cinerea* (González, Brito, y González, 2014; Schumacher, 2012). Con respecto a la NLS, una de las más empleadas en hongos es SV40 (Schuster y Kahmann, 2019), pero como se ha probado previamente el buen resultado del uso de dos copias en tándem de StuNLS tras el gen *Cas9* en *B. cinerea* (Leisen *et al.*, 2020), esta será la NLS que empleemos.

Con respecto al gen de selección, optamos por el gen *hgh* de *E. coli*, que codifica para la higromicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a higromicina (Hamada, Reignault, Bompeix, y Boccara, 1994).

Además de esto, el DNA lineal debe contener secuencias homólogas al DNA del hongo para que se inserte de este modo en el genoma mediante HR. Según el estudio de Noda *et al.* (2007), el tamaño adecuado de las regiones flanqueantes para que se dé eficientemente la recombinación es de 500 pb. Pretendemos integrar el vector en el loci de la nitrato reductasa (*niaD*), por lo que el DNA lineal tendrá regiones flanqueantes para la recombinación con *niaD* (Schumacher, 2012).

Para generar el plásmido que contenga todas estas secuencias, se amplificarían cada una de ellas mediante PCR y se ensamblarían mediante el método Gibson (Gibson, 2017). En este método se emplea un plásmido linearizado y los fragmentos lineales que se quieren ensamblar. Los fragmentos de interés contienen 20-80 pb con la misma secuencia que el extremo del fragmento adyacente, de modo que los diferentes fragmentos recombinan en estos extremos formándose de manera rápida un plásmido con todos los fragmentos deseados (fig. 9). El plásmido formado debe contener, además de las secuencias que queremos introducir en *B. cinerea*, los elementos necesarios para su amplificación en *E. coli* y sitios de restricción que permitan cortar el plásmido para liberar el DNA a transformar. Por ello empleamos un plásmido útil para la amplificación en *E. coli*, como pRs426NcoI (Schumacher, 2012). De este modo, tras la replicación del plásmido en *E. coli*, con el uso de enzimas de restricción, podrá obtenerse el DNA lineal que contenga los elementos necesarios para transformar *B. cinerea* (Cas9 optimizado, gen de resistencia a higromicina y flancos homólogos para la integración en el loci *niaD*, Fig. 9).

Para la transformación se emplea la cepa B05.10 de *B. cinerea* (Büttner *et al.*, 1994), y se realiza siguiendo el método de Hamada *et al.* (1994), modificado por van Kan *et al.* (1998), basado en la generación de protoplastos y la transformación mediada por PEG.

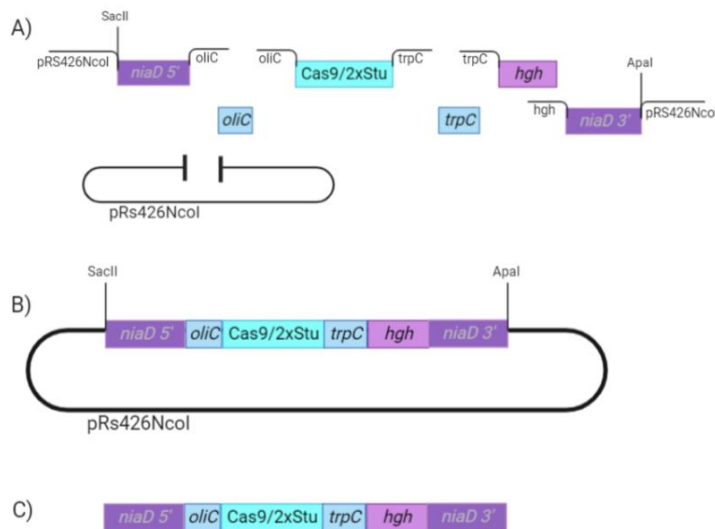


Fig. 9. Formación del vector lineal. A) Fragmentos de interés que se ensamblan por el método de Gibson. B) Resultado del plásmido formado. C) DNA lineal obtenido tras el uso de enzimas de restricción (*SacI* y *ApaI* en este ejemplo). (imagen generada con BioRender.com)

Como el DNA lineal que hemos empleado para la transformación de *B. cinerea* incluía el gen de resistencia a higromicina, la selección de las cepas que expresen Cas9 se puede hacer en un medio con higromicina, de forma que las colonias que crezcan en ese medio serán las que hayan incorporado el DNA lineal y, por lo tanto, las que expresan Cas9.

Estudio del efecto de la expresión de Cas9

En primer lugar, sería conveniente comprobar la expresión de Cas9, por ejemplo, mediante PCR cuantitativa o mediante Western blot. Además, es necesario comprobar que la expresión constitutiva de la nucleasa no tiene efectos que alteren las características del hongo. Al tratarse del estudio de *B. cinerea*, del cual nos interesa conocer y modificar genes relacionados con su patogenicidad, sería conveniente comprobar si la expresión de Cas9 tiene efectos en el crecimiento y virulencia del hongo.

Para comprobar que no hay alteraciones en el crecimiento se miden parámetros como las velocidades de crecimiento de los radios de las colonias, la producción de conidias, o la producción de esclerocios. Idealmente, todos estos parámetros deberían ser indistinguibles entre las cepas que expresan Cas9 y la silvestre, demostrándose así que Cas9 no afecta al crecimiento. También podrían comprobarse parámetros adicionales como la resistencia al estrés, al someter ambas cepas a condiciones de estrés oxidativo (Fuller *et al.*, 2015).

Para comprobar si la expresión de Cas9 afecta a la virulencia podemos inducir la infección de varias especies vegetales por parte de ambas cepas de *B. cinerea*. No debería haber

diferencias en cuanto al daño producido (radios del área de infección, por ejemplo) por la cepa silvestre y la cepa que expresa Cas9 (Fuller *et al.*, 2015).

Diseño y expresión del sgRNA

Como ya se ha mencionado, el sgRNA debe contener una secuencia de 20 nucleótidos complementarios al DNA diana, junto con una estructura de alrededor de 80 nucleótidos esencial para la unión de Cas9, de modo que permitirá la formación del complejo Cas9-sgRNA y el reconocimiento del DNA diana.

A la hora de elegir cuál será la secuencia diana, hay que tener en cuenta dos puntos importantes. La primera característica que debe cumplir la secuencia diana es encontrarse próxima a un PAM. Este requisito es relativamente sencillo, ya que el PAM usado por la proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (spCas, que es la proteína Cas que vamos a emplear) consiste en la secuencia NGG, siendo “N” cualquier nucleótido. Este motivo se repite en el DNA aproximadamente una vez cada 8 pb, lo que permite dirigir esta técnica a la mayoría de sitios del genoma (Jinek *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016). El segundo punto a tener en cuenta es que la secuencia diana debe corresponder a un gen fácilmente observable, es decir, se tiene que reconocer de manera sencilla si la secuencia está mutada o no, de manera que podamos comprobar si el corte ha afectado al gen deseado.

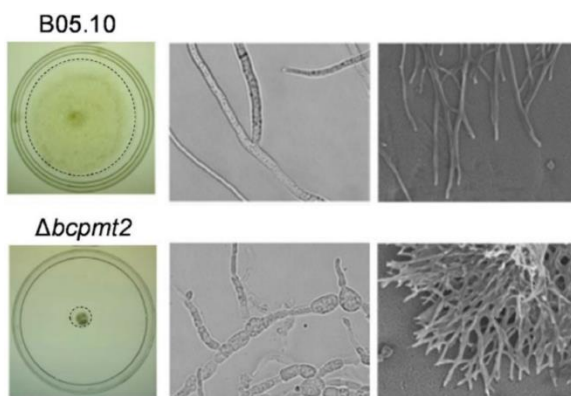


Fig. 10. Diferencias entre cepas de *Botrytis cinerea* silvestre (B05.10) (arriba) y mutante para el gen *Bcpmt2* (debajo). A la izquierda se observa el crecimiento de las colonias en agar YGG (las líneas discontinuas indican el borde de las colonias). En el centro se muestran las imágenes de las hifas en medio MB bajo el microscopio, y a la derecha vistas con microscopio electrónico de barrido. (imagen modificada de González *et al.*, 2013)

Teniendo en cuenta esto, optamos por el gen *Bcpmt2* como gen diana, ya que su fenotipo permite diferenciar si el gen está mutado. Los mutantes de *Bcpmt2* ($\Delta bcpmt2$) no crecen en los medios habituales de *B. cinerea* (GB5, MEA y PDA), pero sí si se les añaden estabilizantes osmóticos o en los medios YGG y SH, que son más ricos. En los medios en los que crece $\Delta bcpmt2$, las colonias son pequeñas y compactas, y vistas al microscopio, se observa que sus células son más gruesas, presentan células globulares, y muestran hifas septadas e hiperraminificadas (González, Brito, Frías, y González, 2013) (Fig. 10).

Una vez que hemos elegido el gen diana, para el diseño del sgRNA existen diversos recursos, muchos de ellos *on line*, tales como CRISPOR (Haeussler *et al.*, 2016), E-CRISP (Heigwer, Kerr, y Boutros, 2014), y CHOPCHOP (Labun *et al.*, 2019). Estos programas seleccionan secuencias diana de 20 nucleótidos teniendo en cuenta el funcionamiento del sistema CRISPR-Cas. La secuencia complementaria al gen de interés se vincularía a la secuencia no variable que permite la unión a Cas9, obteniéndose así el sgRNA (Jinek *et al.*, 2012). Para conseguir *in vitro* dicho sgRNA se podría solicitar a proveedores de oligonucleótidos o bien obtener en el laboratorio mediante transcripción *in vitro* (Schuster y Kahmann, 2019).

Una vez que tenemos el sgRNA purificado, se inserta en los protoplastos que ya expresan Cas9, mediante transformación mediada por PEG junto con el molde de DNA para HDR que se explica continuación.

Introducción del molde para la reparación

La reparación mediante HDR aumenta la eficacia en la HR, aumentando la frecuencia de recombinación al producirse el DSB. Por ejemplo, la HR en *Penicillium chrysogenum* aumentó seis veces con el uso de CRISPR-Cas en comparación con la HR tradicional (Schuster y Kahmann, 2019).

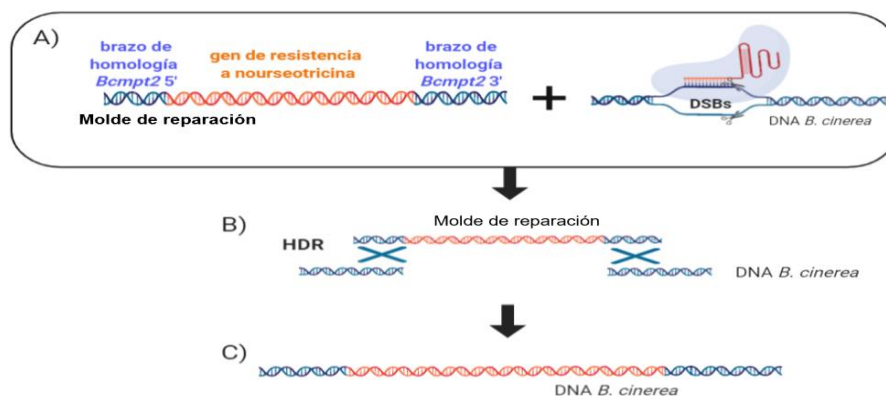


Fig. 11. CRISPR-Cas y reparación mediante HDR. A) CRISPR-Cas produce uno o varios DSBs en el genoma (derecha) que deben repararse para que las células sean viables, su reparación puede hacerse usando el DNA donante que contiene brazos de homología para el gen *Bcmpt2* y el gen de resistencia a nourseotricina (izquierda). B) Como resultado se produce HDR. C) El gen de resistencia a nourseotricina queda integrado, interrumpiendo al gen *Bcmpt2*. (imagen generada con BioRender.com)

El DNA donante o plantilla de reparación consta del gen que queremos introducir y brazos de homología para permitir la recombinación y la introducción del gen de interés en una localización específica del genoma (Fig. 11). En este caso queremos introducir un gen que permita la selección de las colonias en las que el sistema ha funcionado, por lo que

optamos por el gen de resistencia a nourseotricina (Schumacher, 2012). En *B. cinerea*, aunque se requieren 500pb para HR tradicional (Noda *et al.*, 2007), parece suficiente una longitud de 60 pb para los flancos de homología tras un corte producido por CRISPR-Cas (Leisen *et al.*, 2020), por lo que el molde de reparación contendrá brazos de homología de 60 pb que le permitan insertarse en el loci *Bcmpt2*.

Comprobación del funcionamiento de CRISPR-Cas

Al emplear en todo momento genes de selección, se pueden seleccionar fácilmente aquellas colonias en las que CRISPR-Cas ha funcionado. Si el sistema ha actuado correctamente, Cas9 habrá producido un DSB en *Bcmpt2* y la plantilla de reparación que contiene el gen de resistencia a nourseotricina se habrá integrado en ese sitio del genoma. Por lo tanto, las cepas resultantes tendrán el fenotipo propio de $\Delta bcpmt2$ y serán resistentes a nourseotricina. Con un medio en el que pueda crecer $\Delta bcpmt2$ y en presencia de nourseotricina se podrían seleccionar las cepas recombinantes. Además, se comprobará si realmente el gen de resistencia a nourseotricina se ha integrado en el loci deseado en base al fenotipo de estas cepas. Si se ha dado correctamente, las cepas transformantes tendrán el fenotipo propio de $\Delta bcpmt2$, es decir, colonias pequeñas y compactas con hifas septadas y ramificadas, y células gruesas.

Aportaciones de la aplicación de CRISPR-Cas en *Botrytis cinerea*

Mediante otras técnicas se han estudiado distintos genes relacionados con la patogenicidad de *B. cinerea*, como por ejemplo *Bcpg1*, *Bcpls1* o *cutA* (González *et al.*, 2016). Sin embargo, utilizando CRISPR-Cas se podrían obtener mutantes de una manera mucho más eficiente y rápida en comparación con otras técnicas de generación de mutantes. Podría estudiarse, por ejemplo, el papel de distintas proteínas de secreción. En estudios de proteómica se han identificado varias de estas proteínas (algunas sin función conocida), y podrían estar relacionadas con la virulencia del hongo (Espino *et al.*, 2010; González *et al.*, 2014). Mediante CRISPR-Cas podríamos generar mutantes de manera rápida y sencilla para comprobar el papel de estas proteínas en la patogenicidad de *B. cinerea*.

Así, el empleo de CRISPR-Cas en *B. cinerea* constituiría un avance enorme en el conocimiento de su patogenicidad; esto llevaría a mejores métodos para impedir la invasión de cultivos y plantas ornamentales por parte del hongo, lo que supondría una disminución de las pérdidas económicas que causa *B. cinerea*.

Conclusiones

-Los sistemas CRISPR se descubrieron como sistemas inmunes adaptativos, pero en los últimos años se han aplicado como método de edición genética, demostrando ser una herramienta muy eficiente.

-El empleo de CRISPR-Cas en hongos ofrece ventajas frente a otras técnicas de edición genética, y ya ha sido empleada en muchas especies demostrándose su utilidad práctica.

-CRISPR-Cas podría aplicarse en *Botrytis cinerea* mediante la generación de cepas que expresen Cas9, y su posterior transformación con el sgRNA y el DNA molde necesario para la reparación dirigida por homología. Esto facilitaría el estudio de los genes relacionados con la virulencia del hongo.

Conclusions

-CRISPR systems were discovered as adaptive immune systems, but in recent years they have been applied as a genetic editing method, and proved to be a very efficient tool.

-The use of CRISPR-Cas in fungi offers advantages over other genetic editing techniques, and it has already been tested in many species, showing its practical utility.

-CRISPR-Cas could be used in *Botrytis cinerea* by generating a strain that expresses Cas9, and by its subsequent transformation with the sgRNA and the template DNA needed for the homology directed repair. This would facilitate the study of genes related to the virulence of the fungus.

Bibliografía

- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Liu, D. R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576(7785), 149–157. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- Araoz, T., & Mizutani, O. (2020). Targeted genome editing using CRISPR/Cas9 system in fungi. In *Genome Engineering via CRISPR-Cas9 System* (pp. 45–67). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818140-9.00005-2>
- Askew, D. S. (2008). *Aspergillus fumigatus*: virulence genes in a street-smart mold. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4), 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.05.009>
- Benito, E. P., Arranz, M., & Eslava, A. P. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17(1), 43–46.
- Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Tudzynski, P. (1994). Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current Genetics*, 25(5), 445–450. <https://doi.org/10.1007/BF00351784>
- Campos de Olivera, T. (2016). metodologias para a geração de mutantes funcionais em *Metarhizium anisopliae*: CRISPR/Cas9 e RNAi. *Revista Brasileira de Ergonomia*, 9(2), 10. <https://doi.org/10.5151/cidi2017-060>
- Chaves, N., & Wang, A. (2004). Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. *Agronomia Costarricense*, 28(2), 73–85.
- Chen, J., Lai, Y., Wang, L., Zhai, S., Zou, G., Zhou, Z., Wang, S. (2017). CRISPR/Cas9-mediated efficient genome editing via blastospore-based transformation in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports*, 8(April), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep45763>
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Deng, H., Gao, R., Liao, X., & Cai, Y. (2017). CRISPR system in filamentous fungi: Current achievements and future directions. *Gene*, 627, 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.06.019>
- Díaz Sánchez, C., & López Viña, A. (2004). *Aspergillus* y pulmón. *Archivos de Bronconeumología*, 40(3), 114–122. [https://doi.org/10.1016/s0300-2896\(04\)75486-1](https://doi.org/10.1016/s0300-2896(04)75486-1)
- Dicarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., & Church, G. M. (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 41(7), 4336–4343. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt135>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213). <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Elad, Y., Vivier, M. and Fillinger, S. (2016). *Botrytis*, the good, the bad and the ugly. In Y. Fillinger, S. and Elad (Ed.), *Botrytis: The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. (pp. 1–15). Springer.
- Espino, J. J., Gutiérrez-Sánchez, G., Brito, N., Shah, P., Orlando, R., & González, C. (2010). The *Botrytis cinerea* early secretome. *Proteomics*, 10(16), 3020–3034. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000037>
- Fuller, K. K., Chen, S., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2015). Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 14(11), 1073–1080. <https://doi.org/10.1128/EC.00107-15>
- Gaj, T., Gersbach, C. A., & Barbas, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>

- Gibson, D. (2017). *Gibson Assembly Cloning Guide 2nd Edition*. 1–44. Retrieved from https://www.biocat.com/bc/files/Gibson_Guide_V2_101417_web_version_8.5_x_11_FINAL.pdf
- González, C., Brito, N., & Sharon, A. (2016). Infection Process and Fungal Virulence Factors. In S. Fillinger & Y. Elad (Eds.), *Botrytis - The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (pp. 229–246). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>
- González, M., Brito, N., Frías, M., & González, C. (2013). *Botrytis cinerea* Protein O-Mannosyltransferases Play Critical Roles in Morphogenesis, Growth, and Virulence. *PLoS ONE*, *8*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065924>
- González, M., Brito, N., & González, C. (2014). Identification of glycoproteins secreted by wild-type *Botrytis cinerea* and by protein O-mannosyltransferase mutants. *BMC Microbiology*, *14*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0254-y>
- Gray, W. D., & Hesseltine, C. W. (1970). The use of fungi as food and in food processing. *CRC Critical Reviews in Food Technology*, *1*(2), 225–329. <https://doi.org/10.1080/10408397009527104>
- Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., Renaud, J.-B., Concordet, J.-P. (2016). Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology*, *17*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2>
- Hamada, W., Reignault, P., Bompeix, G., & Boccard, M. (1994). Transformation of *Botrytis cinerea* with the hygromycin B resistance gene, hph. *Current Genetics*, *26*(3), 251–255. <https://doi.org/10.1007/BF00309556>
- Hatoum-Aslan, A. (2018). Phage genetic engineering using CRISPR–Cas systems. *Viruses*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/v10060335>
- Hefferin, M. L., & Tomkinson, A. E. (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair*, *4*(6), 639–648. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.12.005>
- Heigwer, F., Kerr, G., & Boutros, M. (2014). E-CRISP: Fast CRISPR target site identification. *Nature Methods*, *11*(2), 122–123. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2812>
- Hsu, P., Lander, E., & Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, *157*(6), 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Idnurm, A., & Meyer, V. (2018). The CRISPR revolution in fungal biology and biotechnology, and beyond. *Fungal Biology and Biotechnology*, *5*(1), 18–21. <https://doi.org/10.1186/s40694-018-0064-3>
- Ishino, Y., Krupovic, M., & Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of Bacteriology*, *200*(7). <https://doi.org/10.1128/JB.00580-17>
- Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, *43*(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Jiang, D., Zhu, W., Wang, Y., Sun, C., Zhang, K. Q., & Yang, J. (2013). Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: Recent advances and new strategies. *Biotechnology Advances*, *31*(8), 1562–1574. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.005>
- 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*, *337*(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Karginov, F. V., & Hannon, G. J. (2010). The CRISPR System: Small RNA-Guided Defense in Bacteria and Archaea. *Molecular Cell*, *37*(1), 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.033>
- Katayama, T., Tanaka, Y., Okabe, T., Nakamura, H., Fujii, W., Kitamoto, K., & Maruyama, J. (2016). Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology Letters*, *38*(4), 637–642. <https://doi.org/10.1007/s10529-015->

2015-x

Kück, U., Bloemendal, S., & Teichert, I. (2014). Putting Fungi to Work: Harvesting a Cornucopia of Drugs, Toxins, and Antibiotics. *PLoS Pathogens*, *10*(3), 3–6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003950>

Labun, K., Montague, T. G., Krause, M., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H., & Valen, E. (2019). CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Research*, *47*, W171–W174. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz365>

Lammoglia-Cobo, M. F., Lozano-Reyes, R., García-Sandoval, C. D., Avilez-Bahena, C. M., Muñoz-Soto, R., Trejo-Reveles, V., & López-Camacho, C. (2016). La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. *Investigación de Discapacidad*, *5*(2), 116–128. Retrieved from www.medigraphic.org.mx

Lander, E. S. (2016). The Heroes of CRISPR. *Cell*, *164*, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041>

Leisen, T., Bietz, F., Werner, J., Wegner, A., Schaffrath, U., Scheuring, D., Hahn, M. (2020). CRISPR/Cas with ribonucleoprotein complexes and transiently selected telomere vectors allows highly efficient marker-free and multiple genome editing in *Botrytis cinerea*. *BioRxiv*, 2020.01.20.912576. <https://doi.org/10.1101/2020.01.20.912576>

Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. (2018). Delivering crispr: A review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*, *25*(1), 1234–1257. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>

Liu, F., Selin, C., Zou, Z., & Dilantha Fernando, W. G. (2020). LmCBP1, a secreted chitin-binding protein, is required for the pathogenicity of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica napus*. *Fungal Genetics and Biology*, *136*. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103320>

Liu, Q., Gao, R., Li, J., Lin, L., Zhao, J., Sun, W., & Tian, C. (2017). Development of a genome-editing CRISPR/Cas9 system in thermophilic fungal *Myceliophthora* species and its application to hyper-cellulase production strain engineering. *Biotechnology for Biofuels*, *10*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0693-9>

Liu, R., Chen, L., Jiang, Y., Zou, G., & Zhou, Z. (2017). A novel transcription factor specifically regulates GH11 xylanase genes in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, *10*(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0878-x>

López Mancheño, Y. A. (2015). *Ingeniería genómica mediante sistemas CRISPR-Cas*.

Matsu-ura, T., Baek, M., Kwon, J., & Hong, C. (2015). Efficient gene editing in *Neurospora crassa* with CRISPR technology. *Fungal Biology and Biotechnology*, *2*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40694-015-0015-1>

McLean, K. J., Hans, M., Meijrink, B., Van Scheppingen, W. B., Vollebregt, A., Tee, K. L., ... Van Den Berg, M. A. (2015). Single-step fermentative production of the cholesterol-lowering drug pravastatin via reprogramming of *Penicillium chrysogenum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(9), 2847–2852. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419028112>

Mojica, F. J. M., & Montoliu, L. (2016). On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. In *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.005>

Muñoz, C. (2008). Identificación rápida de distintas razas de *Botrytis cinerea*. *Revista Enología*, *6*, 1–5.

Musunuru, K. (2017). The hope and hype of CRISPR-Cas9 genome editing: A review. *JAMA Cardiology*, *2*(8), 914–919. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2017.1713>

Noda, J., Brito, N., Espino, J. J., & González, C. (2007). Methodological improvements in the expression of foreign genes and in gene replacement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, *8*(6), 811–816. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00432.x>

Nødvig, C. S., Nielsen, J. B., Kogle, M. E., & Mortensen, U. H. (2015). A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS ONE*, *10*(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133085>

Pohl, C., Kiel, J. A. K. W., Driessen, A. J. M., Bovenberg, R. A. L., & Nygård, Y. (2016). CRISPR/Cas9 Based

- Genome Editing of *Penicillium chrysogenum*. *ACS Synthetic Biology*, 5(7), 754–764.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00082>
- Polturak, G., Grossman, N., Vela-Corcia, D., Dong, Y., Nudel, A., Pliner, M., Aharoni, A. (2017). Engineered gray mold resistance, antioxidant capacity, and pigmentation in betalain-producing crops and ornamentals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(34), 9062–9067. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707176114>
- Qin, H., Xiao, H., Zou, G., Zhou, Z., & Zhong, J. J. (2017). CRISPR-Cas9 assisted gene disruption in the higher fungus *Ganoderma species*. *Process Biochemistry*, 56, 57–61.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.02.012>
- Román, E., Coman, I., Prieto, D., & Alonso-monge, R. (2019). crosssm Implementation of a CRISPR-Based System for Gene. *Molecular Biology and Physiology*, 4(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1128/msphere.00001-19>
- Satish, L., Shamili, S., Muthubharathi, B. C., & Antony, S. (2020). *CRISPR-Cas9 system for fungi genome engineering toward industrial applications*.
- Schumacher, J. (2012). Tools for *Botrytis cinerea*: New expression vectors make the gray mold fungus more accessible to cell biology approaches. *Fungal Genetics and Biology*, 49(6), 483–497.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.03.005>
- Schuster, M., & Kahmann, R. (2019). CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 130(April), 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.04.016>
- Serrano, J. J. (2014). CRISPR/Cas9: La enésima revolución. *Encuentros En La Biología*, 7(152), 207–210.
- Shi, T. Q., Liu, G. N., Ji, R. Y., Shi, K., Song, P., Ren, L. J., ... Ji, X. J. (2017). CRISPR/Cas9-based genome editing of the filamentous fungi: the state of the art. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(20), 7435–7443. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8497-9>
- Umeyama, T., Hayashi, Y., Shimosaka, H., Inukai, T., Yamagoe, S., Takatsuka, S., Miyazaki, Y. (2018). CRISPR/Cas9 genome editing to demonstrate the contribution of Cyp51A Gly138Ser to azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(9), 1–6.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00894-18>
- Van Kan, J. A. L., Ten Have, A., Mulder, W., & Visser, J. (1998). The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required to full virulence of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(10), 1009–1016.
<https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.10.1009>
- Vanegas, K. G., Lehka, B. J., & Mortensen, U. H. (2017). SWITCH: A dynamic CRISPR tool for genome engineering and metabolic pathway control for cell factory construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0632-x>
- Vidal Liy, M. (2018). Científicos chinos aseguran haber creado los primeros bebés modificados genéticamente. Retrieved April 2, 2020, from elpais.com website:
https://elpais.com/elpais/2018/11/26/ciencia/1543224768_174686.html
- Waltz, E. (2016). Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature*, 532, 293.
<https://doi.org/10.1038/nature.2016.19754>
- Wang, H., La Russa, M., & Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 227–264. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014607>
- Wang, M., Weiberg, A., Lin, F. M., Thomma, B. P. H. J., Huang, H. Da, & Jin, H. (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*, 2(10), 1–10.
<https://doi.org/10.1038/nplants.2016.151>