

**Diseño *in silico* de un vector de edición genética en fresa (*Fragaria vesca*) para la resistencia a *Botrytis cinerea***

***In silico* design of a genetic editing vector in strawberry (*Fragaria vesca*) for resistance to *Botrytis cinerea***

Linder Ramírez-Viena<sup>1,a,\*</sup>, Carlos Pesantes-Rojas<sup>1,b</sup>, Mao Yupanqui-Celestino<sup>1,c</sup>

<sup>1</sup> Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, Huacho, Perú.

<sup>a</sup> Dr., ✉ [lr Ramirez@unjfsc.edu.pe](mailto:lr Ramirez@unjfsc.edu.pe),  <https://orcid.org/0009-0009-1939-7566>

<sup>b</sup> Dr., ✉ [cpesantes@unjfsc.edu.pe](mailto:cpesantes@unjfsc.edu.pe),  <https://orcid.org/0009-0007-8472-3044>

<sup>c</sup> Blgo., ✉ [cusy2000@gmail.com](mailto:cusy2000@gmail.com),  <https://orcid.org/0000-0003-3984-7981>

\* Autor de Correspondencia: Tel. +51 990 079 024

<http://doi.org/10.25127/riagrop.20262.1191>

<http://revistas.untrm.edu.pe/index.php/RIAGROP>  
[revista.riagrop@untrm.edu.pe](mailto:revista.riagrop@untrm.edu.pe)

Recepción: 05 de enero 2026

Aprobación: 23 de febrero 2026

Este trabajo tiene licencia de Creative Commons.  
Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0  
International Public License – CC-BY-NC-SA 4.0



## Resumen

La fresa (*Fragaria vesca*) es un cultivo de alto valor económico y nutricional, susceptible a infecciones por *Botrytis cinerea*, un patógeno fúngico que ocasiona pérdidas severas en calidad y rendimiento. Debido al uso excesivo de fungicidas y al aumento de cepas resistentes, se exploraron estrategias biotecnológicas alternativas. En este estudio, se diseñó un vector de edición genética para inducir la sobreexpresión del gen *FaSnRK1α*, conocido por activar la vía de defensa mediada por ácido salicílico. Se identificó la secuencia codificante de *FvSnRK1α* en la base de datos Phytozome y se realizó un análisis filogenético con especies relacionadas. Posteriormente, se diseñaron ARN guías (sgRNA) específicas mediante CHOPCHOP, considerando eficiencia mayor al 60 %, posición en la región promotora, sin off-targets y baja autocomplementariedad. Se seleccionaron tres sgRNAs candidatas y se construyó *in silico* un vector binario con el gen dCas9-VP64 bajo el promotor CaMV 35S, los sgRNA bajo promotores U6, y el gen de selección nptII. La estructura fue verificada como vector funcional para

activación dirigida de genes. Estos resultados demuestran que el diseño racional de vectores CRISPRa en fresa puede ser una herramienta eficaz para mejorar la resistencia genética frente a *B. cinerea* mediante sobreexpresión controlada de genes defensivos.

**Palabras claves:** *Fragaria vesca*, *Botrytis cinerea*, CRISPRa, dCas9-VP64, *SnRK1*, activación génica.

### Abstract

Strawberry (*Fragaria vesca*) is a crop of high economic and nutritional value, highly susceptible to *Botrytis cinerea*, a fungal pathogen responsible for severe postharvest losses. Due to fungicide resistance and environmental concerns, biotechnological strategies have gained attention. In this study, a genetic vector was designed to induce overexpression of the *FaSnRK1a* gene, which plays a central role in salicylic acid-mediated defense. The coding sequence of *FvSnRK1a* was retrieved from Phytozome, and a phylogenetic analysis was conducted with related species. Guide RNAs (sgRNAs) were designed using CHOPCHOP, prioritizing candidates with >60% predicted efficiency, location within 500 bp upstream of the ATG, zero off-targets, and low self-complementarity. Three top sgRNAs were selected and used to build an in silico binary vector containing the dCas9-VP64 gene driven by the CaMV 35S promoter, each sgRNA under a U6 promoter, and the selectable marker nptII. The vector map was constructed and verified. These findings suggest that rational CRISPRa vector design can serve as an efficient tool for genetic resistance improvement in strawberry against *B. cinerea* by targeted gene activation.

**Keywords:** *Fragaria vesca*, *Botrytis cinerea*, CRISPRa, dCas9-VP64, *SnRK1*, gene activation.

## 1. INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria vesca*) es un fruto aromático, nutritivo y el más atractivo del mundo. Presenta una vasta distribución a nivel global debido a su diversidad genotípica, naturaleza altamente heterocigota y amplia gama de adaptaciones ambientales (Gaston *et al.*, 2020). Por lo tanto, las fresas enfrentan diversas enfermedades durante todo el crecimiento siendo estos hongos, bacterias, virus y nemátodos (Hsu *et al.*, 2014). Siendo los hongos las mayores responsables en la muerte de las plantas y la pérdida de cantidad como en calidad de la fresa. Se conoce que el hongo *Botrytis cinerea* ocasiona daños severos aproximadamente en más de 200 especies de plantas (Dean *et al.*, 2012; Williamson *et al.*, 2007). También es considerado como el principales patógeno fúngico más grande de la fresa debido al daño severo que ocasiona al fruto (Feliziani y Romanazzi, 2016).

Es indispensable el uso de tratamientos de control basados principalmente en fungicidas para reducir la incidencia de *B. cinerea* en la mayoría de las especies hospedantes comercialmente importantes (Dean *et al.*, 2012; Fontana *et al.*, 2021). Sin embargo, el uso intensivo y, en ocasiones, inadecuado de estos productos han contribuido al desarrollo de cepas resistentes, lo cual reduce significativamente la eficacia de los tratamientos y compromete el manejo fitosanitario a largo plazo (Leroch *et al.*, 2011; Leroux *et al.*, 2010). A esto se suma el impacto negativo sobre la salud humana y el ambiente, debido a la acumulación de residuos químicos en el suelo, el agua y los productos agrícolas (Veloukas *et al.*, 2011).

Diversas investigaciones ayudaron a comprender los efectos de los patógenos fúngicos en plantas, los cuales llegaron reportaron resultados a nivel molecular y

defensivo de las fresas, además de su mecanismo contra *B. cinerea* y otros patógenos (Jia *et al.*, 2020; Sham *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2021). Las evidencias señalan la resistencia a patógenos través de una compleja red molecular de defensa afinada por fitohormonas como el ácido jasmónico (JA), el ácido salicílico (SA) y el etileno (ET), las cuales regulan la respuesta defensiva para enfrentar eficientemente los diferentes patógeno (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011), se conoce que la vía de señalización JA/ET se activa contra patógenos necrótrofos como *B. cinerea*. La respuesta frente al patógeno se debe a que el JA induce a la activación de diferentes genes de respuesta defensiva y la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios, entre las cuales se encuentran los alcaloides, compuestos fenólicos y terpenos (Liu *et al.*, 2015; Zhou y Memelink, 2016). Las líneas transgénicas investigadas en *Arabidopsis* que sobreexpresan ORA59 o ERF1 confieren resistencia a *B. cinerea* (Kazan y Manners, 2013), entre tanto las líneas silenciadas con RNAi-ORA59 son más susceptibles (Pré *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que la proteína quinasa *FaSnRK1α* cumple un rol central en la activación de la vía de defensa mediada SA en fresa frente al ataque de *Botrytis cinerea*. Su sobreexpresión conduce a una inducción temprana de genes relacionados con la defensa, como PR1 y PR5, lo cual fortalece la respuesta inmune de la planta (Luo *et al.*, 2024). Líneas transgénicas que expresan *FaSnRK1α* llegan a mostrar una reducción significativa del estrés oxidativo y una menor propagación del patógeno en tejido foliar, evidenciando un aumento en la resistencia (Hulsmans *et al.*, 2016). La aplicación exógena de SA potencia aún más este efecto, indicando una acción sinérgica entre esta

quinasa y la señalización hormonal de defensa (Rodrigues *et al.*, 2013). Estos hallazgos posicionan a *FaSnRK1α* como una herramienta biotecnológica prometedora para el desarrollo de cultivares de fresa con mayor tolerancia a enfermedades fúngicas, tales como *Botrytis cinerea*.

El sistema CRISPR/Cas se ha convertido en la herramienta más popular en ediciones genéticas porque permite eliminar, generar y reparar funcionalidades de algún gen en específico (Hsu *et al.*, 2014). Las amplias aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9 se deriva de su capacidad para apuntar al ADN, basado en una secuencia de sgRNA sintético, específicamente los 20 nucleótidos de la secuencia guía (gRNA) en el extremo 5' de la secuencia de sgRNA (Hsu *et al.*, 2013; Sternberg *et al.*, 2014). Por ello, el diseño de sgRNA es determinante en la especificidad de direccionamiento y en la eficiencia de escisión, debido a que si se presenta actividad de Cas9 fuera del objetivo (off-target) puede dar lugar a efectos inesperados (Cho *et al.*, 2014; Minguet, 2020). Los casos de off-target se producen porque existen secuencias similares al gRNA en otras partes del genoma. En los últimos años se han realizado estudios para el desarrollo de métodos bioinformáticos para diseñar secuencias de sgRNA con efectos reducidos fuera del objetivo, este tipo de diseños en computadoras es denominado *in silico* (Biswas *et al.*, 2013; Doench *et al.*, 2016; Lawhorn *et al.*, 2014). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue diseñar un vector de edición genética que exprese dCas9-VP64 y sgRNA dirigido a la región promotora de *FaSnRK1α*, con la finalidad de inducir su sobreexpresión en *Fragaria vesca* como estrategia de resistencia frente a *Botrytis cinerea*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Identificación de la secuencia de *FvSnRK1α*

Se realizó una búsqueda de genes pertenecientes de *Fragaria vesca* en la base de datos de Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). La selección del gen se realizó filtrando solo para codificación de proteína de *FvSnRK1α*. Se seleccionó el gen 50696427 con la accesión *Fragaria vesca* v4.0.a2 (Phytozome genome ID: 677, NCBI taxonomy ID: 57918). Adicionalmente se seleccionó el gen *SnRK1α* de otras especies vegetales para el alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos y a partir de estas secuencias se realizó la construcción del árbol filogenético mediante conexión vecina empleando el software MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>), con un valor fijo en 1000 bootstrap.

### 2.2. Diseño *in silico* de ARN guías para *FaSnRK1α*

El diseño de los ARN guías (sgRNA) para CRISPR/Cas9 se llevó usando la herramienta en línea CHOP CHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>), con las opciones de genoma de *Fragaria*, la región codificante de *FvSnRK1α* añadido con 500 pb para tener en consideración la región promotora y la opción de activación para la finalidad de dCas9. Se seleccionaron los mejores sgRNA basado en el porcentaje de eficiencia (>60%), ubicación dentro de los 500 bp previos al ATG, bajo número de off-targets (MM0 = 0) y autocomplementariedad baja (0–1).

### 2.3. Construcción *in silico* del vector de edición genética

Una vez seleccionados los sgRNA se continuará con el diseño *in silico* del vector de edición genética, para ello se empleará el software A plasmid Editor (ApE) (<https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/appe/>), la estructura fue diseñada para el casete de expresión de dCas9-VP64 por el Promotor CaMV 35S, gen dCas9 fusionado a VP64 y Terminador NOS. Para el casete de sgRNAs se empleó uno múltiple cada uno con su respectivo Promotor U6 y finalmente el marcador de selección fue el gen nptII (resistencia a kanamicina).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

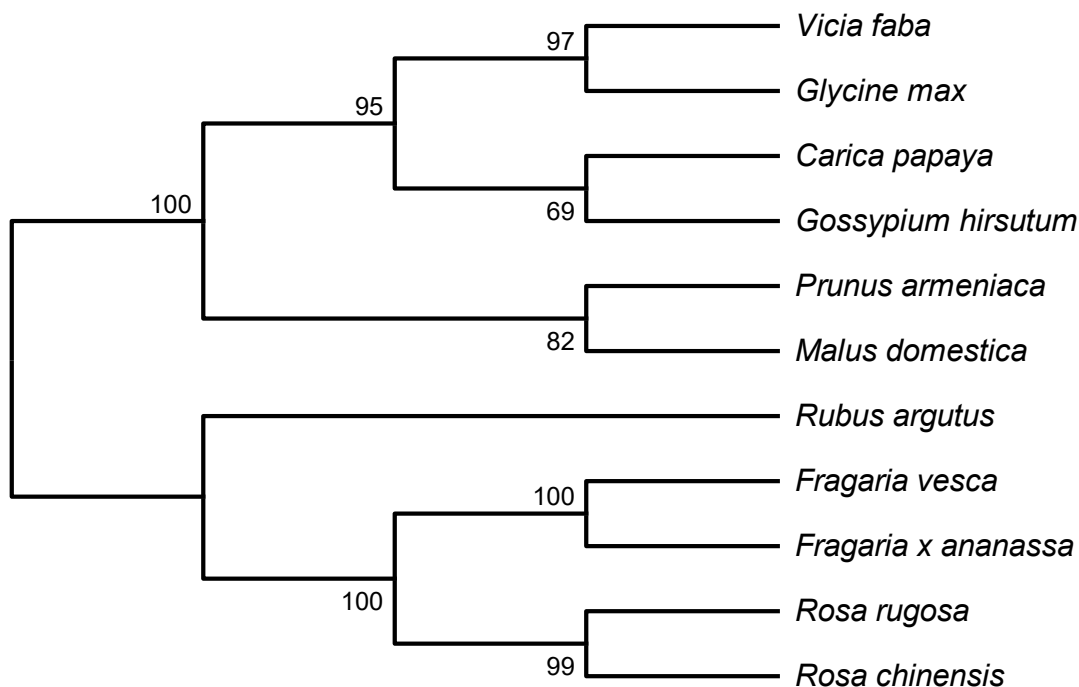
### 3.1. Análisis de secuencias de *SnRK1α*

La secuencia del gen *FvSnRK1α* presenta una longitud de 1686 pb, mientras que el CDS presenta una longitud de 846 pb que codifican para una proteína de 282 aminoácidos. A partir de estos resultados se realizó el alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos con otras especies vegetales de mayor similitud (Tabla 1). Dentro de la agrupación de aminoácidos de *SnRK1α* homologas se puede evidenciar la agrupación estrecha que presenta *FvSnRK1α* con *FaSnRK1α*, seguido de *RgSnRK1α* y *RcSnRK1α*, lo que indica que *SnRK1α* en fresas comparte una relación cercana con las de rosas, mientras que, con algodón, papaya, soja y haba presenta una relación distante, siendo estas dos últimas especies las más distanciada (Figura 1). El gen *SnRK1* está presente en las muestras vegetales y cumple función catabólica y participa en la movilización de recursos en esta transición del desarrollo (Henninger *et al.*, 2022). Así mismo, estructuralmente el complejo *SnRK1* consta de

una subunidad  $\alpha$  catalítica y subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  reguladoras (Crepin y Rolland, 2019).

**Tabla 1.** Acciones del gen *SnRK1 $\alpha$*  de especies vegetales seleccionadas para alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos para el gen *FvSnRK1 $\alpha$*

N°	Accesión	Especie	Porcentaje de identidad (%)
1	KAL6179965.1	<i>Fragaria x ananassa</i>	97.80
2	XP_061988769.1	<i>Rosa rugosa</i>	87.97
3	XP_040366081.1	<i>Rosa chinensis</i>	86.42
4	KAK9905284.1	<i>Rubus argutus</i>	79.55
5	XP_008356361.1	<i>Malus domestica</i>	74.18
6	CAB4267181.1	<i>Prunus armeniaca</i>	73.36
7	XP_003544806.1	<i>Glycine max</i>	71.98
8	CAI8582860.1	<i>Vicia faba</i>	69.60
9	XP_021900788.1	<i>Carica papaya</i>	69.57
10	XP_016693512.1	<i>Gossypium hirsutum</i>	68.48



**Figura 1.** Análisis del árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de *FvSnRK1 $\alpha$*  y *SnRK1 $\alpha$*  de otras especies seleccionadas

### 3.2. Diseño *in silico* de ARN guías para *FaSnRK1 $\alpha$*

En el diseño *in silico* de los sgRNA se encontraron un total de 114 secuencias de sgRNA candidatos, de los cuales se seleccionaron tres top hits (Tabla 2), los cuales cumplieron con las consideraciones de estar dentro de las primeras 500 pb previos al ATG que correspondieran a la región del promotor y con porcentaje de eficiencia mayor a >60%, también con MM0 igual a 0 y

autocomplementariedad baja entre 0 y 1. Estos resultados forman parte de búsqueda de eficiencia descrita por otros trabajos (Hernández-Amasifuen *et al.*, 2024; Moreno-Mateos *et al.*, 2015). También es importante considerar el rango de autocomplementariedad que debe ser menor a 1, rangos establecidos para la selección de top hits de sgRNA (Pratami *et al.*, 2022), con la finalidad de no formar orquídeas que inhiben la escisión formados por el apareamiento de nucleótidos (Thyme *et al.*, 2016).

**Tabla 2.** Lista de ARN guías con las consideraciones necesarias para la edición de *FvSnRK1 $\alpha$*

sgRNA	Ubicación genómica	Hebra	Contenido de GC (%)	Auto complementariedad	MM0	MM1	MM2	Eficiencia (%)
TAAAATGCAGCTAT GGAAGGTGG	490	+	40	0	0	2	0	66.38
TCTTAGTGCCTTAC ACGATAGG	365	+	40	1	0	2	0	60.95
TAAAATGCAGAAT GGGAGTGGGG	402	-	35	0	0	1	2	62.04

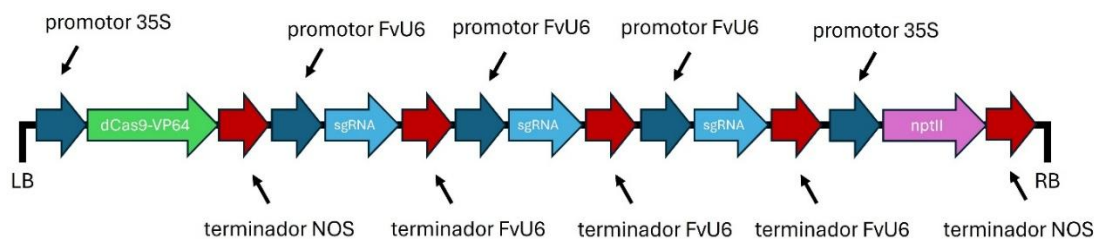
### 3.3. Construcción *in silico* del vector de edición genética

Para el diseño del vector de mediante dCas9 para la sobreexpresión de *SnRK1*, se insertó las secuencias de los tres sgRNA, cada uno con sus respectivos sRNA scaffold e impulsados por el promotor FvU6-26, y adicionalmente se agregó el marcador de selección nptII (insertado con un promotor 35S y terminador NOS), obteniendo el vector dCas9-FvSnRK1-3XsgRNA (Figura 2). En este tipo de constructos se consideraron los métodos de diseño desarrollados para la construcción del vector pCas9-TPC::FvCDIP1\_2XgRNA, vector que desarrollaron con resultado exitoso debido a

que los sgRNA diseñados y la endonucleasa Ca9 lograron los objetivos establecidos con el knockout del gen de la Proteína inductora de la muerte celular 1 de *Fragaria vesca* (Poudel, 2021). Así mismo, demostrando que el vector puede ser modificado para la inserción de tres secuencias de sgRNA (Fauser *et al.*, 2014), considerando lo realizado en anteriores diseños de vectores de edición para fresa con múltiples sgRNA (Hernández-Amasifuen *et al.*, 2024). La elección del promotor FvU6-26 se enfocó por las recomendaciones de estudios previos en el uso de promotores nativos, con los cuales se logra obtener mayor eficiencia de mutación en la región objetivo (Sun *et al.*, 2015), como se

demonstró en también en fresa, mediante el uso del promotor nativo U6III de *Fragaria vesca*, el cual fue más efectivo en la obtención de

mutantes en *Fragaria vesca* cv. Hawaii (Wilson *et al.*, 2019).



**Figura 2.** Región de ADN-T del vector dCas9-FvSnRK1-3XsgRNA para la edición del gen SnRK1, RB y LB indican el borde derecho y el borde izquierdo del ADN-T del vector.

#### 4. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró la viabilidad del diseño *in silico* de un vector CRISPRa basado en dCas9-VP64 para la activación dirigida del gen *SnRK1α* en *Fragaria vesca*. La selección rigurosa de sgRNAs y la construcción de un vector con elementos genéticos compatibles con el sistema de transformación en plantas brindan una base sólida para futuras aplicaciones funcionales. Esta herramienta biotecnológica representa un avance hacia el desarrollo de cultivares de fresa con mayor resistencia a *Botrytis cinerea*, sin alterar directamente la secuencia génica, y abre nuevas oportunidades para la edición genética de precisión en especies frutales.

#### Declaración de intereses

Ninguna.

#### Referencias

Biswas, A., Gagnon, J.N., Brouns, S.J.J., Fineran, P.C. & Brown, C.M. (2013). CRISPRTarget: Bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets. *RNA Biology*, 10(5), 817–827. <https://doi.org/10.4161/rna.24046>

Cho, S.W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H.S., Bae, S. & Kim, J.S. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Research*, 24(1), 132–141. <https://doi.org/10.1101/gr.162339.113>

Crepin, N. & Rolland, F. (2019). SnRK1 activation, signaling, and networking for energy homeostasis. *Current Opinion in Plant Biology*, 51, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.03.006>

Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. & 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>

Doench, J.G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E.W., Donovan, K.F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H.W., Listgarten, J. & Root, D.E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 34(2), 184–191. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>

Fausser, F., Schiml, S. & Puchta, H. (2014). Both CRISPR / Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *A rabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 79(2), 348–359. <https://doi.org/10.1111/tpj.12554>

Feliziani, E. & Romanazzi, G. (2016). Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. *Journal of Berry Research*, 6(1), 47–63. <https://doi.org/10.3233/JBR-150113>

- Fontana, D.C., Neto, D.D., Pretto, M.M., Mariotto, A.B., Caron, B.O., Kulczynski, S.M. & Schmidt, D. (2021). Using essential oils to control diseases in strawberries and peaches. *International Journal of Food Microbiology*, 338, 108980. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108980>
- Gaston, A., Osorio, S., Denoyes, B. & Rothan, C. (2020). Applying the Solanaceae Strategies to Strawberry Crop Improvement. *Trends in Plant Science*, 25(2), 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.10.003>
- Henninger, M., Pedrotti, L., Krischke, M., Draken, J., Wildenhain, T., Fekete, A., Rolland, F., Müller, M.J., Fröschel, C., Weiste, C. & Dröge-Laser, W. (2022). The evolutionarily conserved kinase SnRK1 orchestrates resource mobilization during Arabidopsis seedling establishment. *The Plant Cell*, 34(1), 616–632. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab270>
- Hernández-Amasifuen, A.D., Yupanqui-Celestino, M., Jherina Pineda-Lázaro, A., Delgado-Mera, E., Ramírez-Viena, L., Pesantes-Rojas, C.R. & Corazon-Guivin, M.A. (2024). In silico design of sgRNA for CRISPR/Cas9-mediated FaRALF33 gene mutagenesis to decrease the infection process to Colletotrichum acutatum in strawberry. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. <https://doi.org/10.7324/JABB.2024.172044>
- Hsu, P.D., Lander, E.S. & 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>
- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini, L.A., Bao, G. & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(9), 827–832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- Hulsmans, S., Rodriguez, M., De Coninck, B. & Rolland, F. (2016). The SnRK1 Energy Sensor in Plant Biotic Interactions. *Trends in Plant Science*, 21(8), 648–661. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.008>
- Jia, S., Wang, Y., Zhang, G., Yan, Z. & Cai, Q. (2020). Strawberry FaWRKY25 Transcription Factor Negatively Regulated the Resistance of Strawberry Fruits to Botrytis cinerea. *Genes*, 12(1), 56. <https://doi.org/10.3390/genes12010056>
- Kazan, K. & Manners, J.M. (2013). MYC2: The Master in Action. *Molecular Plant*, 6(3), 686–703. <https://doi.org/10.1093/mp/sss128>
- Lawhorn, I.E.B., Ferreira, J.P. & Wang, C.L. (2014). Evaluation of sgRNA Target Sites for CRISPR-Mediated Repression of TP53. *PLoS ONE*, 9(11), e113232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113232>
- Leroch, M., Kretschmer, M., & Hahn, M. (2011). Fungicide Resistance Phenotypes of Botrytis cinerea Isolates from Commercial Vineyards in South West Germany: Fungicide Resistance of B. cinerea Isolates from Vineyards. *Journal of Phytopathology*, 159(1), 63–65. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01719.x>
- Leroux, P., Gredt, M., Leroch, M. & Walker, A.S. (2010). Exploring Mechanisms of Resistance to Respiratory Inhibitors in Field Strains of Botrytis cinerea, the Causal Agent of Gray Mold. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19), 6615–6630. <https://doi.org/10.1128/AEM.00931-10>
- Liu, S., Kracher, B., Ziegler, J., Birkenbihl, R.P. & Somssich, I.E. (2015). Negative regulation of ABA signaling by WRKY33 is critical for Arabidopsis immunity towards Botrytis cinerea 2100. *eLife*, 4, e07295. <https://doi.org/10.7554/eLife.07295>
- Luo, J., Yu, W., Xiao, Y., Zhang, Y. & Peng, F. (2024). FaSnRK1 $\alpha$  mediates salicylic acid pathways to enhance strawberry resistance to Botrytis cinerea. *Horticultural Plant Journal*, 10(1), 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2023.05.006>
- Minguet, E.G. (2020). Ares-GT: Design of guide RNAs targeting multiple genes for CRISPR-Cas experiments. *PLOS ONE*, 15(10), e0241001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241001>
- Moreno-Mateos, M.A., Vejnár, C.E., Beaudoin, J.D., Fernandez, J.P., Mis, E.K., Khokha, M.K. & Giraldez, A.J. (2015). CRISPRscan: Designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nature Methods*, 12(10), 982–988. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3543>
- Poudel, M. (2021). *Functional characterization of putative disease resistance genes of strawberry* [Norwegian University of Life Sciences]. <https://hdl.handle.net/11250/2828207>
- Pratami, M., Fendiyanto, M., Satrio, R., Nikmah, I., Awwanah, M. & Farah, N. (2022). In-silico Genome Editing Identification and Functional Protein Change of Chlamydomonas reinhardtii Acetyl-CoA Carboxylase (CrACCase). *Jordan Journal of Biological Sciences*, 15(03), 431–440. <https://doi.org/10.54319/jjbs/150312>
- Pré, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C.M.J. & Memelink, J. (2008). The AP2/ERF Domain Transcription Factor ORA59 Integrates Jasmonic Acid and Ethylene Signals in Plant Defense. *Plant Physiology*, 147(3), 1347–1357. <https://doi.org/10.1104/pp.108.117523>

- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. & Jones, J.D.G. (2011). Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 317–343. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114447>
- Rodrigues, A., Adamo, M., Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Martinho, C., Elias, A., Rabissi, A., Lumbreras, V., González-Guzmán, M., Antoni, R., Rodriguez, P.L. & Baena-González, E. (2013). ABI1 and PP2CA Phosphatases Are Negative Regulators of Snf1-Related Protein Kinase1 Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(10), 3871–3884. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114066>
- Sham, A., Moustafa, K., Al-Shamisi, S., Alyan, S., Iratni, R. & AbuQamar, S. (2017). Microarray analysis of *Arabidopsis* WRKY33 mutants in response to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *PLOS ONE*, 12(2), e0172343. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172343>
- Singh, P., Chien, C.C., Mishra, S., Tsai, C.H. & Zimmerli, L. (2013). The *Arabidopsis* LECTIN RECEPTOR KINASE-VI.2 is a functional protein kinase and is dispensable for basal resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Signaling & Behavior*, 8(1), e22611. <https://doi.org/10.4161/psb.22611>
- Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C. & Doudna, J.A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62–67. <https://doi.org/10.1038/nature13011>
- Sun, X., Hu, Z., Chen, R., Jiang, Q., Song, G., Zhang, H. & Xi, Y. (2015). Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Scientific Reports*, 5(1), 10342. <https://doi.org/10.1038/srep10342>
- Thyme, S.B., Akhmetova, L., Montague, T.G., Valen, E. & Schier, A.F. (2016). Internal guide RNA interactions interfere with Cas9-mediated cleavage. *Nature Communications*, 7(1), 11750. <https://doi.org/10.1038/ncomms11750>
- Veloukas, T., Leroch, M., Hahn, M. & Karaoglanidis, G.S. (2011). Detection and Molecular Characterization of Boscalid-Resistant *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry. *Plant Disease*, 95(10), 1302–1307. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-11-0317>
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. & Van Kan, J.A.L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561–580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- Wilson, F.M., Harrison, K., Armitage, A.D., Simkin, A.J. & Harrison, R.J. (2019). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of phytoene desaturase in diploid and octoploid strawberry. *Plant Methods*, 15(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0428-6>
- Xie, W., Ke, Y., Cao, J., Wang, S., & Yuan, M. (2021). Knock out of transcription factor WRKY53 thickens sclerenchyma cell walls, confers bacterial blight resistance. *Plant Physiology*, 187(3), 1746–1761. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab400>
- Zhou, M. & Memelink, J. (2016). Jasmonate-responsive transcription factors regulating plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances*, 34(4), 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.02.004>