



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE POSTGRADO

**Inactivación de genes de susceptibilidad mediante edición génica como método para generar resistencia al “Huanglongbing” en *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.**

Tesis/AFE para optar al Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias

**SANDRA ENIDD SOPALDA PRINCE**

Director de Tesis/AFE:  
Dr. Carlos Muñoz

Profesores consejeros:  
Prof. Alan Zamorano  
Prof. María L. Prat.

Colaborador:  
Dr. Humberto Prieto

SANTIAGO - CHILE  
2022

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor el Dr. Humberto Prieto, por recibirme en el laboratorio y guiarme a través de las etapas de este proyecto hasta alcanzar los resultados buscados; a Ricardo Vergara, a Giovana Acha, a Marisol Muñoz y a Carlos Aguirre, quienes me apoyaron, ayudaron y proporcionaron las herramientas para desarrollo este proyecto. Así como también a todo el equipo del Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación Regional La Platina del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, quienes me ayudaron a resolver cualquier duda y con quienes pude disfrutar de las horas de trabajo en el laboratorio.

Quiero dar las gracias a la Escuela de Post Grado de la Universidad de Chile, a los profesores y a la secretaria Jeannette, por la disposición y buena voluntad de ayudarme, a los amigos y compañeros que fui conociendo en varias etapas de mis estudios.

Quiero agradecer al Programa de Becas de IFARHU-SENACYT de Panamá, por brindarme la oportunidad de estudiar en el extranjero y desarrollarme profesionalmente durante estos años.

También quiero agradecer al Proyecto de SENACYT, al Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) y al Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), por el financiamiento de este proyecto en colaboración entre Chile y Panamá y darme la oportunidad de participar en el proceso de investigación.

Por último, quiero agradecer a mis amigos y familiares, quienes me han apoyado durante todo este tiempo y me han ayudado a levantar los ánimos cuando estos decaían. Principalmente, a mis padres y hermanos, quienes siempre han estado allí para darme apoyo, palabras de aliento y momentos de felicidad.

Muchas gracias a todos.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, hermanos y sobrinos.

## INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. HIPÓTESIS	13
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo general	13
3.2. Objetivos específicos	13
4. METODOLOGÍA	
4.1. Ubicación del estudio	14
4.2. Material biológico	14
4.3. Tratamientos y Unidad experimental	14
4.3.1. Tratamientos	14
4.3.2. Unidad experimental	14
4.4. Manejo de experimento	14
4.4.1. Establecimiento en cultivo <i>in vitro</i> de <i>Citrus</i> spp.	14
4.4.1.1. Introducción de explantes a cultivos <i>in vitro</i>	15
4.4.1.1.1. Medio de generación de brotes en <i>Citrus</i> spp. (CiSM).	15
4.4.1.2. Inducción de la formación de callos en <i>Citrus</i> spp.	15
4.4.1.2.1. Medio de generación de callos en <i>Citrus</i> spp. (CiCM)	16
4.4.2. Análisis <i>in silico</i> del gen de susceptibilidad en <i>Citrus sinensis</i> ante HLB.	16
4.4.2.1. Identificación de gen S en <i>C. sinensis</i> .	16
4.4.2.2. Diseño de gRNA para CRISPR/Cas9	16
4.4.2.3. Análisis de secuencias	17
4.4.3. Construcción del vector de edición con la pareja de gRNA	17
4.4.4. Transformación de tejido vegetal de <i>Citrus sinensis</i> por Agroinfiltración	17
4.4.4.1. Detección de edición génica.	18
4.4.5. Análisis Estadístico	18
5. RESULTADOS	19
5.1. Implementar un sistema de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Citrus</i> spp. que permita evaluar la edición génica en la especie.	19
5.1.1. Medios de Cultivo de Tejido para <i>Citrus sinensis</i>	19
5.1.1.1. Medio de Introducción	19
5.1.1.2. Medio de Propagación	19
5.1.1.3. Medio de Inducción de Callos	21
5.1.2. Analizar <i>in silico</i> eventuales genes de susceptibilidad de <i>Citrus</i> spp. frente a HLB.	22

5.1.2.1. Identificación y selección de genes de susceptibilidad (S) a HLB en cítricos	22
5.1.2.2. Generación de RNA guías para el Gen S seleccionado.	22
5.1.2.3. Secuenciación y alineamiento del gen <i>CsDMR6</i>	23
5.1.3. Diseño y ensamblaje del vector de edición.	24
5.1.4. Transformación por Agroinfiltración.	24
6. DISCUSIÓN	27
6.1. Implementación del sistema de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Citrus</i> spp.	28
6.2. Análisis <i>in silico</i> de genes de susceptibilidad de <i>Citrus</i> spp. frente a HLB.	28
6.3. Ensamblaje del vector de edición génica para expresar las parejas de sgRNA contra el gen definido.	29
6.4. Evaluar la efectividad de corte del DNA blanco por parte de los editores génicos diseñados (validación) utilizando el sistema de cultivo <i>in vitro</i> implementado	29
7. CONCLUSIONES	31
8. LITERATURA CITADA	32
9. APÉNDICE	36

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Concentración de hormonas reguladoras del crecimiento en los medios de cultivos utilizados para la introducción de explantes y la micropropagación.	16
<b>Cuadro 2.</b> Formación de callos en <i>Citrus sinensis</i> en medio CiCM.	21
<b>Cuadro 3.</b> Parejas de gRNAs y partidores diseñados para el gen <i>DMR6</i> en <i>Citrus sinensis</i> .	23
<b>Cuadro 4.</b> Alineamiento de secuencias del gen <i>CsDMR6</i> editado.	26

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Introducción de explantes de <i>C. sinensis</i> variedad Valencia en medio CiSM 1.25.	20
<b>Figura 2.</b> Micropropagación de <i>C. sinensis</i> ‘Valencia’ en diferentes medios CiSM.	20
<b>Figura 3.</b> Formación de Callos en medio CiCM de <i>C. sinensis</i> cultivo híbrido.	21
<b>Figura 4.</b> Esquema del gen S <i>CsDMR6</i> .	22
<b>Figura 5.</b> Alineamiento de secuencias de gRNAs en cultivares de estudio.	23
<b>Figura 6.</b> Vector de Edición pVK:CsDMR6-A.	25
<b>Figura 7.</b> Detección de Edición Genética.	26

## APENDICES

<b>Figura A1.</b> Micropropagación del cultivo comercial CsH1	36
<b>Figura A2.</b> Micropropagación del cultivo comercial CsH2	36
<b>Figura A3.</b> Esquema de genes S en <i>Citrus sinensis</i> , <i>CsDMR6</i>	37
<b>Figura A4.</b> Alineamiento de secuencias de gRNAs en <i>C. sinensis</i> y <i>Citrus x limón</i> .	37
<b>Cuadro A1.</b> Parejas de gRNAs seleccionados para la edición del gen <i>DMR6</i> en <i>C. sinensis</i> .	38

## RESUMEN

El Huanglongbing es una enfermedad que ataca diversas especies de *Citrus*, causada por la proteobacteria '*Candidatus Liberibacter (spp)*', parásito obligado en el floema de la planta. En busca de una alternativa para controlar la enfermedad, se propone implementar las bases técnicas que posibiliten la edición génica (EG) por CRISPR/Cas9 en *Citrus*, teniendo como objetivo la inactivación de potenciales genes de susceptibilidad al Huanglongbing. En este trabajo, se estableció un sistema de cultivo *in vitro*, evaluando distintos medios de propagación e inducción de callos para explantes de *Citrus sinensis*, donde se pudiera aplicar la EG. Estos experimentos mostraron que el mejor sistema de cultivo y regeneración se obtuvo utilizando segmentos internodales y los medios CiSM1.0 y CiCM, previamente en oscuridad, respectivamente.

Para este último, se diseñaron editores génicos basados en *Geminivirus*, los que fueron ensamblados a través de la reacción Golden Gate, ligando el vector base pVK, conformado por *cassettes* de expresión de Cas9 y la proteína fluorescente verde (GFP), más una pareja de RNAs guías (gRNAs) diseñados a partir de la secuencia del gen candidato de susceptibilidad *CsDMR6*. El vector de edición pVK:CsDMR6-A fue evaluado por un sistema de agroinfiltración de hojas de *C. sinensis*. La expresión de GFP en los explantes indicó la transferencia del vector de edición a las células vegetales, validando la posibilidad de utilizar EG en la especie. Muestras de ADN aisladas después de ser agroinfiltradas fueron evaluadas por PCR y secuenciación, evidenciando una deleción aproximada de 5814 pb en el gen blanco, correspondiente a la acción conjunta de ambos gRNAs incluidos en el vector. La pérdida del fragmento génico permitió validar la construcción del vector pVK:CsDMR6-A, demostrándose que éste generó los cortes simultáneos en el gen *CsDMR6*, tal como se propuso.

Ambas herramientas serán fusionadas en experimentación futura para generar plantas completas que serán evaluadas para el proceso de EG en el germoplasma utilizado.

Palabras Claves: *Candidatus Liberibacter (spp)*, CRISPR/Cas9, Cultivo *in vitro*, *DMR6*, naranjo dulce.

**ABSTRACT**

Huanglongbing is a disease that infects various species of the *Citrus* genus and is caused by the proteobacterium *Candidatus Liberibacter* (spp), an obligate parasite in the phloem of the plant. In the search for alternative practices to control the disease, we propose to develop gene editing (GE) as a tool that allows the inactivation of potential susceptibility genes associated to Huanglongbing. In this work, a GE-compatible *in vitro* culture system was first established, evaluating different propagation and callus induction media for *C. sinensis* explants. The best regeneration results were obtained using internode segments as starting explants and using CiSM1.0 and CiCM media for regeneration.

For GE, a *Geminivirus*-based vector was assembled through the Golden Gate reaction, ligating the pVK vector (harboring Cas9 and green fluorescent protein (GFP) expression cassettes), to a pair of guide RNAs (gRNAs) designed for targeting the candidate susceptibility gene *CsDMR6*. The pVK:*CsDMR6*-A vector was evaluated by an *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer system of *C. sinensis* leaves. GFP expression in explants showed the gene transfer capability of the editing vector into plant cells. PCR analysis of DNA extracts obtained from agro-infiltrated leaf explants showed a deletion of 5,814 bp in the target gene. These results validated the effectiveness of the editing vector pVK:*CsDMR6*-A, by a double-cut of the *CsDMR6* gene as expected.

Both tissue culture and GE tools allow for future experimentation in which whole plants derived from this process will be generated and validated.

**Keywords:** *Candidatus Liberibacter* (spp), CRISPR/Cas9, *in vitro* culture, *DMR6*, sweet oranges.

## 1. INTRODUCCIÓN

El Huanglongbing (HLB), dragón amarillo en chino, también conocido como enverdecimiento de los cítricos, es la enfermedad más devastadora de los cítricos, afectando a distintas especies de importancia comercial, como naranjas (*Citrus sinensis*), toronjas (*Citrus paradisi*) y mandarinas (*Citrus reticulata*). El HLB es causada por tres especies de proteobacterias del género *Candidatus Liberibacter* (*Ca. L*): *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. africanus*, y *Ca. L. americanus*, transmitidas por los psílidos *Diaphorina citri* (Kuwayama) y *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Ramadugu *et al.*, 2016; Rawat *et al.*, 2015). Estas bacterias son parásitos obligados en el floema de la planta, e inducen la degeneración del tejido, lo que lleva al colapso total o parcial del floema debido al taponamiento generado por la acumulación de calosa y p-proteína, impidiendo el transporte de los nutrientes a los brotes, frutos y raíces, afectando la productividad de la planta (Achor *et al.*, 2010).

El HLB es identificado en el campo por los síntomas que la enfermedad produce sobre la fruta y el follaje, los que incluyen hojas amarillentas, nervaduras gruesas, corchosas y amarillas, frutos pequeños con semillas atrofiadas e inversión de colores, caída excesiva de hojas y frutos y, eventualmente, la muerte (Achor *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2018). Entre las medidas de control utilizadas para enfrentar la enfermedad se encuentran: la producción de plantas sanas, la utilización de injertos con variedades tolerantes al HLB, el uso de insecticidas y pesticidas para atacar el vector y la remoción de las plantas infectadas (Hu *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2021).

En estudios de transcriptómica, se ha comparado la expresión génica entre plantas susceptibles y tolerantes al HLB, identificándose genes diferencialmente expresados ante la presencia de HLB. En plantas tolerantes se ha observado que se sobreexpresan genes asociados a la defensa de la planta, como los receptores LRR (Repetición Rica en Leucina) y de interacción proteína-proteína (PPI) (Hu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016). En cambio, en plantas susceptibles, se sobreexpresan genes relacionados con la degradación de la pared celular y con la interacción parásito huésped (Wang *et al.*, 2016).

En su interacción con las plantas, los patógenos explotan genes de susceptibilidad (S) para facilitar su proliferación (Truniger y Aranda, 2009). La existencia de estos genes S propician la enfermedad, siendo productos génicos facilitadores del proceso de infección durante la interacción planta-patógeno. Los genes de “pérdida de susceptibilidad” han sido descritos como variantes (mutaciones) génicas de los genes S, que se traducen en una ganancia de resistencia por parte de la planta. La pérdida de función de un gen a través de una mutación natural se define como una resistencia recesiva, por lo tanto, se requerirían ambos alelos con la mutación para que la resistencia sea observada (Fraser, 1990). Debido a esta característica, los genes de “pérdida de susceptibilidad” en programas de mejoramiento convencional se considera un gran desafío, debido al tiempo y número de retrocruzamientos necesarios para lograr su introgresión a individuos comerciales (Schmitt-Keichinger, 2019). Sin embargo, su ventaja es generar una forma durable y de espectro amplio de resistencia (Pavan *et al.*, 2010).

### **Herramientas biotecnológicas para afectar la expresión de genes S.**

La transformación génica (transgenia) en plantas tiene potencial para abordar este tipo de problemas, por lo cual ésta es una posible medida para controlar el HLB. Reprimir

(*knockdown*) o eliminar (*knockout*) la expresión normal de genes S de forma importante en la célula, permite desarrollar la prueba de concepto para el uso tecnológico de estos genes, como una vía de generar nuevas variedades con resistencia a enfermedades (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Pessina *et al.*, 2016). La utilización de técnicas de RNA interferente (RNAi), ha permitido dar los primeros pasos hacia la generación de individuos resistentes a enfermedades. En cítricos, se ha utilizado para combatir y controlar enfermedades, como al virus de la tristeza del cítrico (CTV) mediante el uso de estructuras “*hairpin*”, (Lopez *et al.*, 2010; Cheng *et al.*; 2015, Cheng *et al.*, 2017). Mientras que para mitigar el HLB se ha desarrollado un método de control del vector *Diaphorina citri*, al silenciar genes relacionados a su crecimiento y desarrollo (Yu *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2019; Hajeri *et al.*, 2014).

El sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, por su acrónimo en inglés) y la proteína Caspasa 9 asociada a CRISPR (Cas9), conforman el mecanismo CRISPR/Cas9, derivado del sistema inmune adaptativo mediado por RNA en bacterias y arqueas, permite degradar específicamente el material genético del invasor (Makarova *et al.*, 2018, Chen *et al.*, 2019). El sistema CRISPR/Cas9 está formado por dos componentes: una nucleasa Cas9 y un RNA guía simple (sgRNA). Este complejo Cas9-sgRNA reconoce la secuencia objetivo o “blanco”, gracias a la complementariedad de bases entre el ADN blanco y la molécula de gRNA, mientras que la enzima Cas9 corta la doble hebra de ADN. Esta ruptura puede ser reparada por dos mecanismos innatos de la célula, uno de ellos es el sistema de Reparación Homóloga (HR, por su acrónimo en inglés) donde se requiere de un molde homólogo, el cual es, generalmente utilizado para introducir mutaciones sitio específicas y remplazar o insertar secuencias en el ADN. Mientras que el segundo sistema es la Unión de Extremos No Homólogos (NHEJ, por su acrónimo en inglés), que no requiere de un molde homólogo para reparar la ruptura de ADN. En este último mecanismo de reparación, es común que se generen inserciones y/o deleciones (*indels*) en el sitio de unión de ambos extremos del ADN cortado, con ello se generan cambios en la secuencia de los genes, que llevan, eventualmente, la inactivación de la función de dicho gen. Esta mutación efectiva en dicha funcionalidad del gen, es lo que da curso a la edición génica (Chen *et al.*, 2019, Zaidi y Mansoor, 2017, Yin *et al.*, 2015).

Recientemente, se han realizado estudios en edición génica con CRISPR/Cas9 en cítricos, para desarrollar plantas resistentes a enfermedades como el cancro de los cítricos, enfermedad producida por la bacteria *Xanthomonas citri*. Jia *et al.* (2017) lograron silenciar la región de codificación (CDS) en ambos alelos del gen de susceptibilidad *CsLOB1* en la naranja y Peng *et al.* (2017) silenciaron la región del elemento de unión de efector (EBE), sitio al que se une el efector PthA4 de la bacteria *Xcc*, evitando que ésta active la expresión del gen *CsLOB1*. Estos antecedentes nos permiten plantear la posibilidad de obtener plantas resistentes a HLB a través de edición génica de genes S con CRISPR/Cas9.

Aumentar la inmunidad natural a HLB a través del entendimiento e implementación de los mecanismos naturales de interacción planta patógeno vía genes S es una alternativa atractiva y promisoría en la interacción naranja-HLB. Sin embargo, será necesario implementar sistemas de edición CRISPR libre de transgenes para modificar estos genes S, abriendo así grandes posibilidades para un rápido desarrollo de cultivares resistentes al HLB que puedan ser comercializados, sin las restricciones que tienen los cultivares transgénicos.

## 2. HIPÓTESIS

El uso de un sistema de dos RNA guías permitirá la inactivación vía CRISPR/Cas9 de genes de susceptibilidad en individuos del género *Citrus* spp.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo General

Desarrollar las herramientas biotecnológicas que permitan la inactivación vía edición génica de potenciales genes relacionados con la susceptibilidad a la enfermedad del Huanglongbing (HLB) en *Citrus* spp.

### 3.2. Objetivos Específicos

1. Implementar un sistema de cultivo *in vitro* de *Citrus* spp. que permita evaluar la edición génica en la especie.
2. Analizar *in silico* eventuales genes de susceptibilidad de *Citrus* spp. frente a HLB y proponer el o los genes específicos para inactivarlos experimentalmente.
3. Desarrollar vectores de edición génica para expresar parejas de RNA guía contra el o los genes definidos.
4. Evaluar la efectividad de corte del DNA “blanco” por parte de los editores génicos diseñados (validación) utilizando el sistema de cultivo *in vitro* implementado.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Ubicación del estudio

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación Regional La Platina del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), ubicado en la comuna de La Pintana, Región Metropolitana.

### 4.2. Material biológico

El estudio se realizó utilizando una planta de naranjo ‘Valencia’, proporcionado por el INIA, y semillas de naranjas híbridas (CsH1, CsH2 y CsH3), compradas en diversos comercios. La planta y las semillas de naranjas fueron introducidas al laboratorio y micropropagadas *in vitro* en un medio Murashige y Skoog (MS; Murashige y Skoog, 1962) complementado con 30 g/L sacarosa, diversas concentraciones de fitohormonas y con antibióticos cuando fuese necesario.

Para la construcción de vectores de edición múltiple guía, se utilizó un vector *Geminivirus* universal modificado (pVK-U) de 18.032 pb, derivado de uno previamente diseñado en el mismo Laboratorio (Acha et al., 2021). Este vector posee, entre otras regiones: un *cassette* de la expresión para múltiples gRNAs, gen de resistencia a kanamicina, sitios de restricción de *BsaI*, ambos bordes del T-DNA y el *cassette* de la expresión de Cas9. El vector ensamblado fue utilizado en transformaciones de células competentes: *Escherichia coli* Survival, y *Agrobacterium tumefaciens* EHA-105 (actualmente *Rhizobium radiobacter*), seleccionando los clones bacterianos que efectivamente lo incorporaron para su uso en las distintas etapas de este trabajo de tesis.

### 4.3. Tratamiento y Unidad Experimental

#### 4.3.1. Tratamientos

Se realizó un tratamiento de agroinfiltración con *A. tumefaciens* portando el vector pVK-U y la pareja de gRNA para el gen *CsDMR6* (pVK:C*sDMR6*).

#### 4.3.2. Unidad Experimental

La unidad experimental correspondió a 10-20 segmentos de hojas de *C. sinensis* de procedencia *in vitro* sembradas en una placa Petri con medios de cultivos correspondientes. Se transformaron entre 150 a 200 explantes.

### 4.4. Manejo de Experimento

#### 4.4.1. Establecimiento de cultivo *in vitro* de *Citrus* spp.

#### 4.4.1.1. Introducción de explantes a cultivos *in vitro*.

**Introducción a partir de semillas.** Las semillas se lavaron con agua, para eliminar la pulpa y mucílago que las rodea, luego se desinfectaron con etanol 76% por 1 min, y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 20% y Tween 20 en agitación por 20 min. Finalmente, se enjuagaron con agua destilada estéril 5 veces. Se eliminó la testa de cada semilla y se colocaron en medios de cultivo CiSM1.0 (Cuadro 1; Singh y Rajam, 2010)

**Introducción a partir de plántulas.** Las ramas pequeñas y jóvenes de la planta fueron cortadas y lavadas con detergente líquido de cocina y agua por 45 min, luego fueron sumergidas en una solución con fungicidas: Benlate (0,5 g/L) y Captan (1,5 g/L) por 1 h en agitación. Se descartó la solución y se lavó con agua destilada estéril los explantes, seguido de una desinfección superficial con alcohol 76% por un 1 min, luego se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 20% y Tween 20 en agitación por 20 min y se enjuagó con agua destilada estéril 5 veces. Finalizada la desinfección, se cortaron segmentos internodales de cada uno de los explantes, y fueron colocados en medio de cultivo CiSM1.0 y CiSM1.25 (Cuadro 1; Pexioto *et al.*, 2010)

Las semillas y plántulas se incubaron a una temperatura de  $26\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  y con un fotoperíodo 16 h luz / 8 h oscuridad, permitiendo la germinación de las semillas y el brote de yemas axilares en las plántulas. Transcurridos 45 d, las plántulas germinadas de las semillas adquirieron el tamaño apropiado para ser micropropagadas. Estas se cortaron entre segmentos internodales y se colocaron en medio sólido MS con sacarosa y las fitohormonas correspondientes (CiSM). Los explantes se sub-cultivaron a medios frescos cada mes, manteniendo el fotoperíodo previamente mencionado.

##### 4.4.1.1.1. Medio de generación de brotes en *Citrus spp.* (CiSM).

Tanto para la introducción y la propagación del cultivar se utilizó el medio MS complementado con 30 g/L sacarosa, 8 g/L de agar y la combinación de reguladores de crecimiento necesario (Cuadro 1) con pH  $5,7\pm 0,1$ . Se distribuyó 20-30 mL del medio en frascos de vidrio tapados y éstos fueron autoclavados.

##### 4.4.1.2. Inducción de formación de callos en *Citrus spp.*

Para la formación de callos se utilizaron los cultivos *in vitro* de cada genotipo estudiado. Las plantas *wild type* (WT) fueron extraídas de los frascos, se cortaron hojas y segmentos nodales de 1 cm aproximadamente. Estos explantes se colocaron en medios para la generación de callos (CiCM), previamente preparados. Las placas se dividieron en dos grupos: uno expuesto a un fotoperíodo 16 h luz / 8 h oscuridad y otro a oscuridad por un periodo de 30 d, ambos a  $26\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Los callos fueron colocados en medio sólido en placas Petri, luego de 30 d.

**Cuadro 1.** Concentración de hormonas reguladoras del crecimiento en los medios de cultivos utilizados para la introducción de explantes y la micropropagación.

Fitohormona	CiSM1.0	CiSM1.25	CiSM2.1+KN1
	mg/L		
BAP	1,0	1,0	2,0
ANA		0,25	0,1
KN			1,0

BAP: 6-Bencilaminopurina; ANA: Ácido naftalenacético; KN: kinetina

#### 4.4.1.2.1. Medio de generación de callos en *Citrus* spp. (CiCM)

El medio CiCM-basal consistió en las sales del medio MS, más 30 g/L de sacarosa, 0,5 g/L de Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) y las fitohormonas: BAP (3,0 mg/L), ANA (0,1 mg/L) y 2,4-D (1,0 mg/L) con pH 5,7±0,1 (Iqbal *et al.*, 2019). Para el proceso de transformación de tejido vegetal se prepararon tres medios diferentes: (1) Medio líquido (CiCM-L); (2) Medio sólido de co-cultivo (CiCM-CoC), con acetosiringona (AS) 100 µM; y (3) Medio sólido con antibióticos (CiCM-KC), con 100 mg/L de kanamicina y 500 mg/L cefotaxima, como método de selección del tejido transformado y control de *A. tumefaciens*, respectivamente.

#### 4.4.2. Análisis *in silico* del gen de susceptibilidad en *Citrus sinensis* ante HLB.

##### 4.4.2.1. Identificación de gen S en *C. sinensis*.

Los genes candidatos relacionados con la respuesta a la infección por HLB de los cítricos se seleccionaron de acuerdo a una búsqueda bibliográfica. Luego se realizó una búsqueda de la secuencia del gen candidato en dos páginas web: Citrus Genome Database (<https://www.citrusgenomedb.org>) y JGI Phytozome13 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), utilizando como referencia el genoma de la naranja dulce (*C. sinensis*). Se esquematizó el gen S con el programa SnapGene Viewer.

##### 4.4.2.2. Diseño de gRNA para CRISPR/Cas9

Se seleccionó una región de la secuencia del gen S para su delección. Estos parámetros fueron ingresados en la herramienta bioinformática Biotools CRISPR Search del Laboratorio de Biotecnología de INIA-La Platina (<http://bioed.bionostra.com/>), se generó una serie de gRNAs y se escogieron dos (gRNA1 y gRNA2), ubicados a cada extremo del gen S. Para confirmar que la secuencia de cada gRNA se encontraba en las muestras se diseñaron dos parejas de partidores que amplifican los segmentos del gen S donde están ubicados los guías.

##### 4.4.2.3. Análisis de secuencias.

Cada segmento a analizar fue amplificado por PCR. Para ello se extrajo ADN genómico de las muestras utilizando el método descrito por Steenkamp *et al.* (1994). La reacción

de PCR se realizó según el protocolo descrito por el Phusion Plus DNA Polymerase de Thermo Scientific, el cual consistió en un programa de 35 ciclos: denaturación a 98°C por 10 seg, hibridación a 64°C por 10 seg y extensión a 72°C por 30 seg en el termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Cada amplicón fue separado a través de electroforesis al 1,5% de agarosa y purificados desde aquí con el kit Zymo Clean Gel recovery (Zymo Research). Las bandas purificadas se ligaron en el vector pCR 4Blunt-pTOPO (Invitrogen) y esta mezcla se utilizó en transformar células competentes *E. coli*. Los plasmidios fueron purificados con el kit Zymo Plasmid Miniprep (Zymo Research) y secuenciados (Macrogen, Seul, Corea del Sur). Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa BioEdit.

#### **4.4.3. Construcción del vector de edición con la pareja de gRNA.**

Los gRNAs fueron incorporados a un vector de edición diseñado y ensamblado en el laboratorio de Biotecnología del INIA-La Platina: pVK-U. Se utilizaron reacciones Golden Gate convencionales, como se ha descrito por Xing *et al.* (2014). Para ello, se amplificaron los sgRNA por PCR, el producto del PCR se agregó a la reacción Golden Gate, que constó de 30 ciclos de: digestión a 37 °C por 10 minutos, ligación a 16°C por 10 min; una digestión final a 55 °C por 10 min y una denaturación a 80 °C por 15 min. Luego el vector ligado con el gRNA de interés (pVK:sgRNA) se utilizó en transformación de células *E. coli* Survival, de Thermo Fisher Scientific, y seleccionaron en un medio LB con kanamicina (100 mg/L). Las colonias de *E. coli* con el vector armado fueron identificados con PCR y confirmados por secuenciación. Por último, los vectores obtenidos fueron utilizados en transformación de células electrocompetentes *A. tumefaciens* EHA105 a través de electroporación, siguiendo los procedimientos descritos por el proveedor (McCormac *et al.* 1998).

#### **4.4.4. Transformación de tejido vegetal de *Citrus sinensis* por Agroinfiltración**

Para la transformación por el método de agroinfiltración mediado por *A. tumefaciens*, que contiene el vector construido (pVK:gRNAs), se utilizaron dos cultivos: CsH3 para la primera transformación y CsH2 para la segunda. Las cepas de *A. tumefaciens* fueron cultivadas en 30 mL de medio líquido LB a 28°C en agitación (180 rpm), durante la noche. Se midió el OD<sub>600</sub> de las bacterias. Luego fueron centrifugadas a 4300 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en CiCM-L, ajustando a una OD<sub>600</sub> entre 0,3-0,5. A este cultivo se agregó 100 µM de AS y se agitó a 180 rpm a 28°C por 2 h. Los explantes utilizados, de 4 semanas de edad, fueron cortados y colocados en 20 mL de medio CiCM-L a 60 rpm. Luego fueron colocadas en la solución de infiltración con *A. tumefaciens*, en agitación por 30 min. Se colocaron los explantes en el medio de co-cultivo (CiCM-CoC) por 2-3 días en oscuridad. Transcurrido el tiempo, los explantes se lavaron con agua destilada dos veces, seguido de dos lavados con agua y antibióticos (400 mg/L cefotaxime y 400 mg/L carbenicilina). Los explantes se colocaron en placas con medio de cultivo para la formación de callos y de selección del tejido transgénico (CiCM-K100C500) por 4 semanas.

#### **4.4.4.1. Detección de edición génica**

**Microscopia.** Para determinar la expresión de la Proteína Fluorescente Verde (GFP, por sus siglas en inglés), se utilizó un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioscope Lab A.1, equipado con los filtros: Set 09 (BP 450-490 nm) y Set 38 (BP 470-540 nm) (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y una lámpara de 470 nm. Las imágenes fueron registradas con una cámara Canon Rebel T3 y el software EOs Utility (Canon Inc. Tokyo, Japón).

**PCR.** Se utilizó la pareja de partidores para generar amplificaciones de ambas versiones del gen (WT y editado), las cuales fueron clonadas y secuenciadas para confirmar la delección generada.

#### **4.4.5. Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de los resultados cuantificables y comparables obtenidos en el transcurso de este trabajo se realizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés), con un nivel de significancia del 5%, para ello se utilizará un programa estadístico como InfoStat.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Implementar un sistema de cultivo *in vitro* de *Citrus* spp. que permita evaluar la edición génica en la especie.

#### 5.1.1. Medios de Cultivo de Tejido para *Citrus sinensis*

##### 5.1.1.1. Medio de Introducción

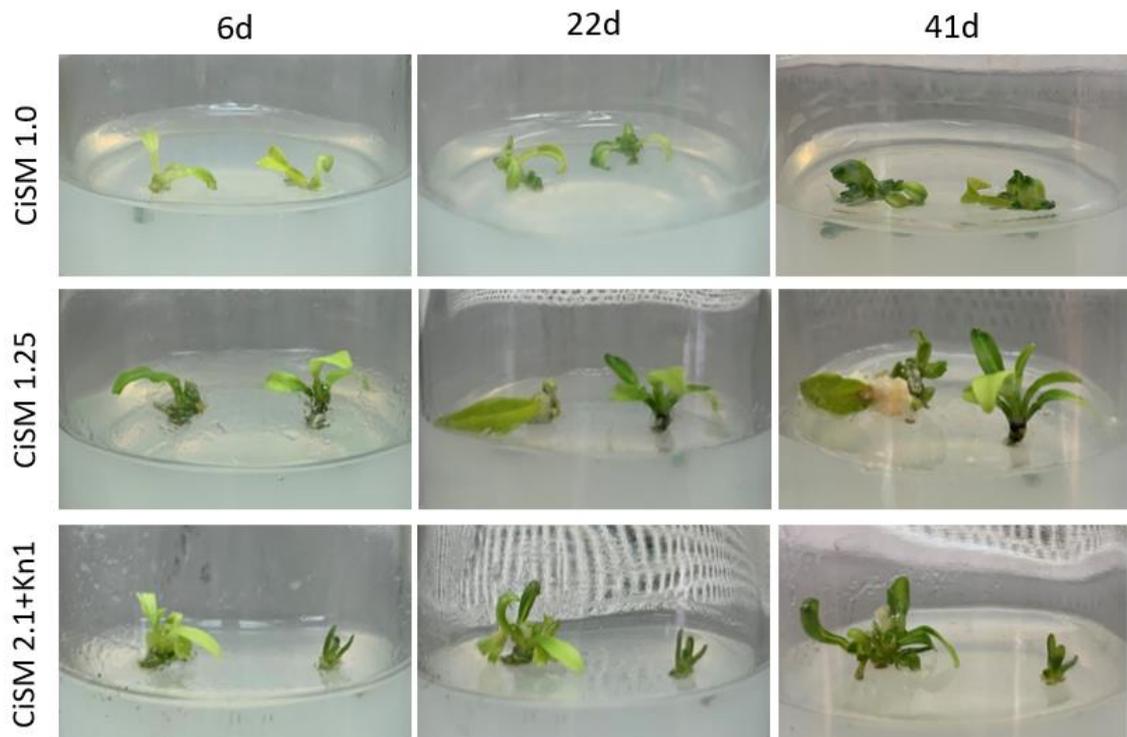
Se logró introducir a cultivo *in vitro* 12 explantes, a partir de segmentos internodales de la plántula de *C. sinensis* 'Valencia', en medio CiSM1.25 (1,0 mg/L de BAP y 0,25 mg/L de ANA). Luego de 30 d, se observó la formación de brotes axilares en 2 explantes (Figura 1). Algunas placas Petri con medio CiSM1.25, que contenían explantes de *C. sinensis* 'Valencia' mostraron contaminación con hongos luego de los 15 d. Previamente en el laboratorio se habían introducido 14 explantes, aproximadamente, de *C. sinensis* 'Valencia' colocados en frascos de vidrio con medio CiSM1.0. Estos explantes no presentaron contaminación, mostraron un crecimiento horizontal sin un alargamiento entre nudos; sin embargo, las plántulas mostraron un mejor desarrollo en comparación a las introducidas en medio CiSM1.25. En cuanto a las naranjas híbridas comerciales, se introdujeron a cultivo *in vitro*, en medio CiSM1.0: 12 semillas de CsH1, 16 semillas de CsH2 y 24 semillas de CsH3. Alrededor de los 30 d estas germinaron y posteriormente fueron elongándose hasta obtener un tamaño aproximado de 3 cm para ser micropropagadas. En ambos casos, introducción a cultivo *in vitro* a partir de plántulas y de semillas, se mostró una mejor respuesta por los explantes al utilizarse el medio CiSM1.0 en frascos de vidrio; sin embargo, se obtuvo una mayor población de plántulas a partir de semillas, ya que estas mostraban un mayor crecimiento vertical (entre nodos), sin contaminación.

##### 5.1.1.2. Medio de Propagación

Se analizaron tres medios de propagación basados en MS con diferentes combinaciones de las fitohormonas: BAP, ANA y kinetina. Se pudo observar que después de 22 d se inició el crecimiento y desarrollo de las hojas en *C. sinensis* 'Valencia' (Figura 2), así como también en los híbridos CsH1 y CsH2 (apéndice: Figura A1 y A2). Al comparar el crecimiento de cada cultivar en los distintos medios, no se evidenció una diferencia de elongación de los explantes; no obstante, se puede distinguir una leve diferencia del crecimiento de las hojas del híbrido CsH1 en el medio CiSM1.0; y los genotipos *C. sinensis* 'Valencia' y CsH2, en CiSM1.25. En general, los cultivos híbridos mostraban una mejor respuesta a los distintos medios, en comparación a *C. sinensis* 'Valencia'.



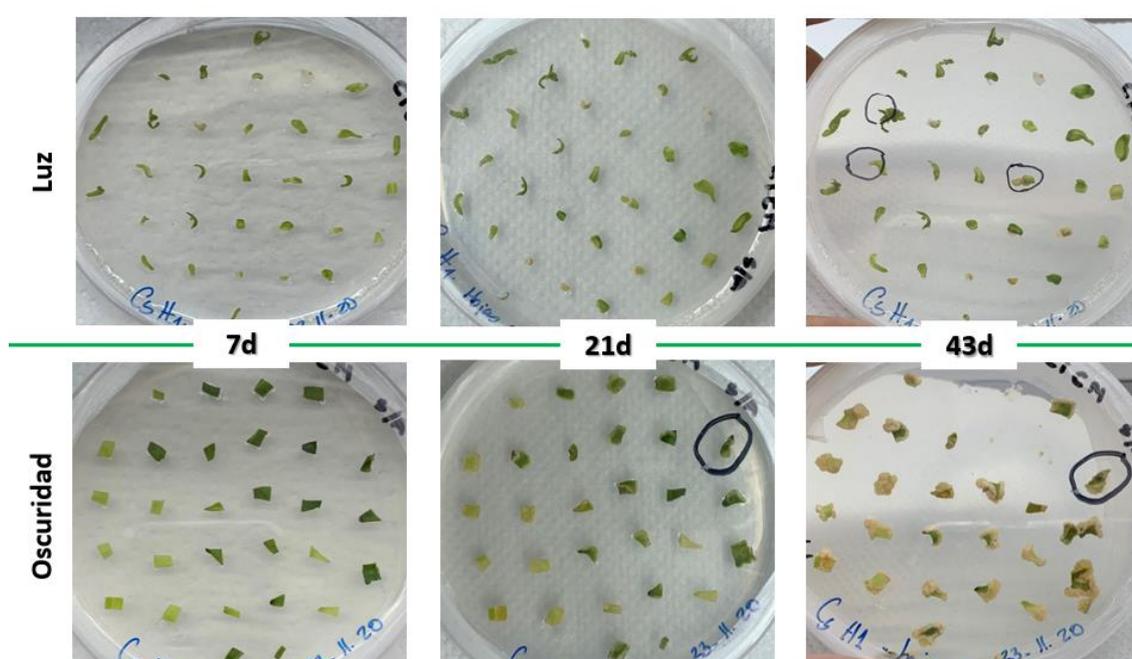
**Figura 1. Introducción de explantes de *C. sinensis* variedad Valencia en medio CiSM 1.25.** Explantes a los 0, 11 y 26 días, previamente desinfectado colocados Medio MS complementado con 30 g/L sacarosa, BAP 1,0 mg/L y ANA 0,25 mg/L, durante 30 d.



**Figura 2. Micropropagación de *C. sinensis* 'Valencia' en diferentes medios CiSM.** Naranja dulce micropropagada en medio MS complementado con 30 g/L sacarosa y hormonas, a los 6, 22 y 41 días. Arriba: BAP 1,0 mg/L; Centro: BAP 1,0 mg/L y ANA 0,25 mg/L; Abajo: BAP 2,0 mg/L, ANA 0,1 mg/L y Kn 1,0 mg/L

### 5.1.1.3. Medio de Inducción de Callos

Para la inducción de formación de callos a partir de hojas WT se utilizó medio sólido CiCM sin antibióticos (BAP 3 mg/L; 2,4D 1 mg/L; NAA 0,1 mg/L) en condiciones de luz y oscuridad (Figura 3). La formación de callos en condiciones de luz (fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad) fue menos eficaz en comparación a oscuridad. En luz, la formación de callos se detectó a partir de 30 d en 3,8% de las hojas; por el contrario, en condiciones de oscuridad, al 7 d, ya se empezó a ver la formación de callo. Transcurridos 30 d, la mayoría de los explantes presentaban indicios de callos. En la Figura 3, se puede observar que después de 43 d las hojas de la variedad comercial CsH1 que estuvieron en oscuridad presentaban callos, en comparación a las que fueron expuestas a luz. Sin embargo, como se muestra en el Cuadro 2, hubo una diferencia en la cantidad de callos formados por el tipo de explante, así como también por las variedades analizadas.



**Figura 3. Formación de callos de *C. sinensis* cultivo híbrido en medio CiCM.** Se indujo la formación de callos en hojas de CsH1, colocadas en dos ambientes: Luz, corresponde a un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad (arriba); y oscuridad (abajo); en medio MS con 30 g/L de sacarosa, 0,5 g/L de Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) y las fitohormonas: BAP (3,0 mg/L), ANA (0,1 mg/L) y 2-4, D (1,0 mg/L).

**Cuadro 2. Formación de callos en *Citrus sinensis* en medio CiCM.**

Variedad	Luz					
	Hoja	Callo	%	Segmento nodal	Callo	%
Valencia	53	2	3.8	15	2	13.3
CsH1	82	4	4.9	16	6	37.5
Oscuridad						
Valencia	49	6	12.2	13	5	38.5
CsH1	33	33	100	31	5	16.1

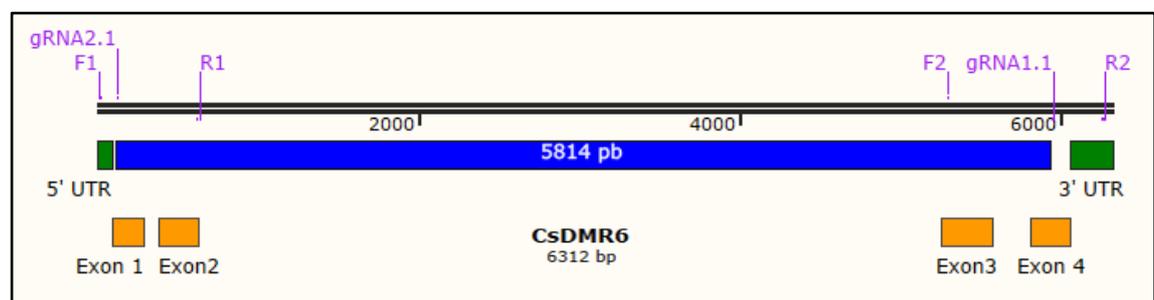
## 5.1.2. Analizar *in silico* eventuales genes de susceptibilidad de *Citrus spp.* frente a HLB.

### 5.1.2.1. Identificación y selección de genes de susceptibilidad (S) a HLB en cítricos

Se propuso como gen S para ser inactivado por edición génica el gen *CsDMR6* (*Downy mildew resistance 6*), pertenece a una familia de oxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato Fe (II) y se ha visto que su expresión es inducida ante la infección de patógenos (van Damme *et al.*, 2008; Zeilmaker *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). Se realizó una búsqueda de este gen en la base de datos Citrus Genome Database y en el sitio web JGI Phytozome, para esquematizar la estructura génica del gen *CsDMR6* con el programa SnapGene Viewer, que permite identificar los exones del gen. El gen *CsDMR6* en naranjas tiene 6312 pares de bases (pb), conformado por: 4 exones y 3 intrones, donde el intrón 2 tiene la particularidad de ser de gran magnitud, respecto de los otros dos.

### 5.1.2.2. Generación de RNA guías para el Gen S Seleccionado.

Identificado y esquematizado el gen, se diseñaron los gRNAs con la herramienta bioinformática Biotools CRISPR Search, implementado por el Laboratorio de Biotecnología. Para ello, se escogió el intrón 2 (4608 pb), como el segmento de posible delección, de tal manera que el programa CRISPR Search pudiera buscar una serie de gRNAs candidatos ubicados a los extremos de esta sección. Estos fueron analizados y se eligieron dos parejas de gRNAs (Cuadro A1) como posibles candidatos. Se trabajó con el par formado por los guías: gRNA1.1, ubicado en el exón 4; y al otro extremo, en el exón 1, el gRNA2.1 (Figura 4 y apéndice). Cada uno de los gRNAs de la pareja de guías está ubicado en segmentos codificantes del ADN, y no reconocen blancos no deseados (*off-targets*) de importancia para el cultivo. Con esta pareja de gRNAs se estimó la pérdida de un fragmento de 5814 pb del gen *CsDMR6* (Cuadro 3 y Figura 4).



**Figura 4. Esquema del gen S *CsDMR6*.** Conformado por 4 exones (color naranja), sitios de amplificación de cada uno de los partidores y sgRNA seleccionados (morado) y la delección en el gen (barra azul). Programa SnapGene Viewer.



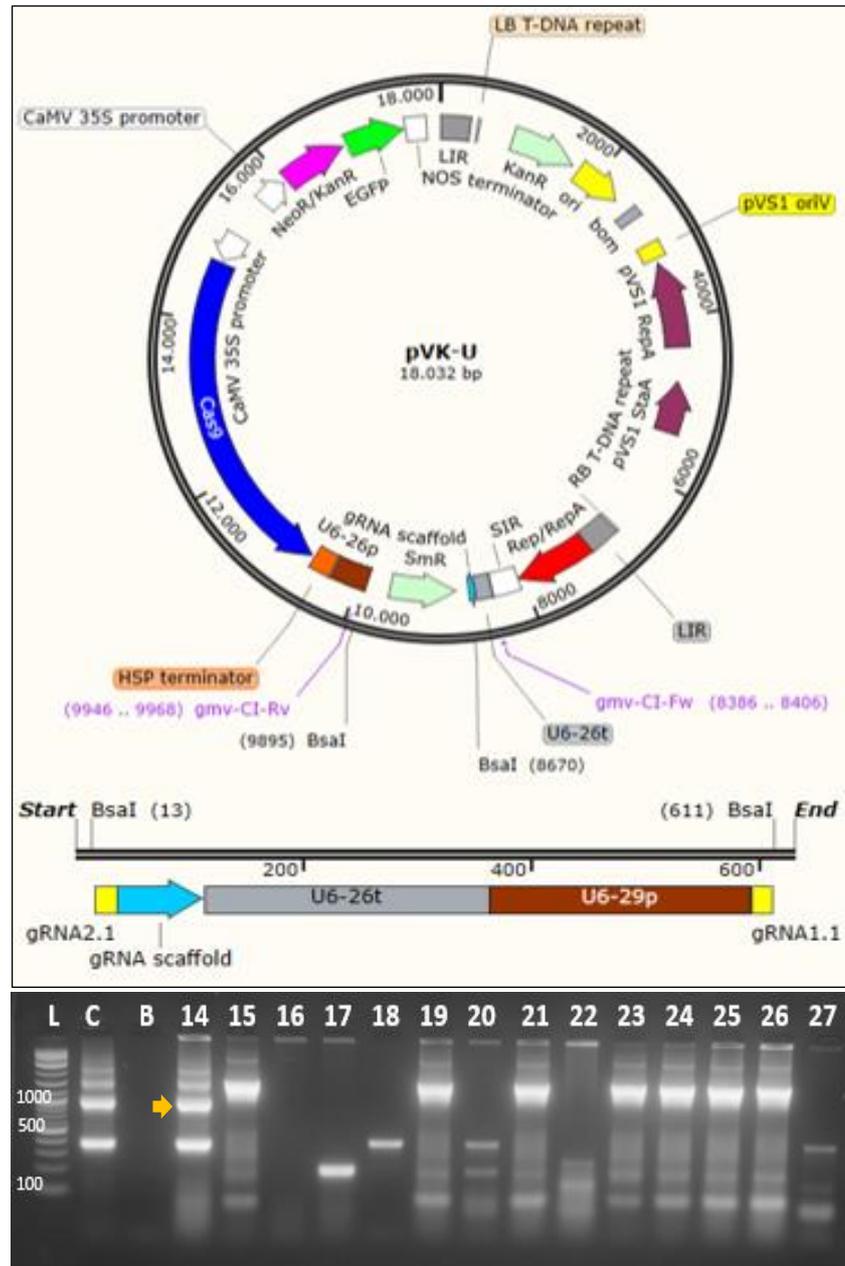
### 5.1.3. Diseño y ensamblaje del vector de edición.

La ligación de la pareja de gRNAs al vector pVK-U se realizó por medio de la reacción Golden Gate (Xing *et al.*, 2014). El vector utilizado posee la capacidad de expresar la proteína Cas9, la proteína GFP y un gen de selección por resistencia a kanamicina, estos últimos permiten una mejor detección y selección de los explantes transformados (Acha *et al.*, 2021). El módulo conformado por la pareja de gRNAs se ligó al vector pVK-U en los puntos de corte de la enzima de restricción *BsaI*, como se muestra esquematizado en la Figura 6A. Para confirmar que el vector de edición pVK:CsDMR6-A se ensambló correctamente, se transformaron células competentes *E. coli* Survival, las cuales se analizaron por PCR y se obtuvo una colonia que mostró el mismo patrón y tamaño de amplicón esperado del vector ensamblado de 926 pb (Figura 6B). Esta amplificación también fue secuenciada y alineada con la secuencia del vector ensamblado *in silico*, dando un 100% de identidad.

### 5.1.4. Transformación por Agroinfiltración.

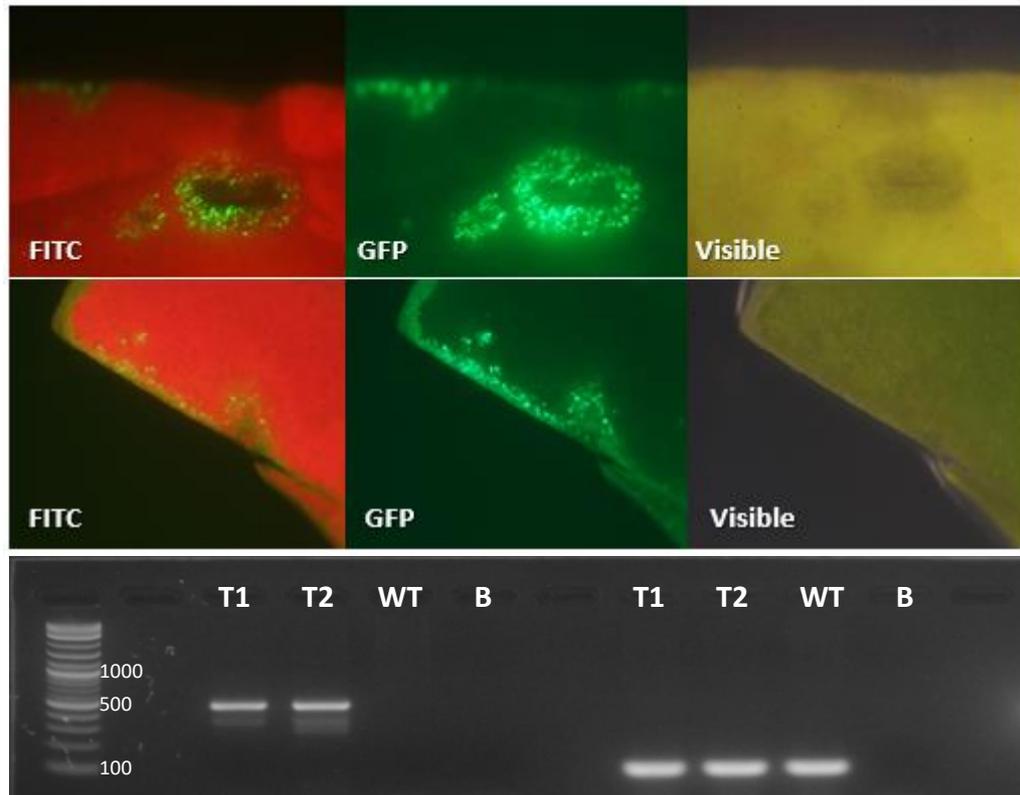
Una vez verificada el correcto armado del vector de edición, éste fue transformado en *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 a través de electroporación. Se realizó una primera transformación (T1) como se encuentra descrito en la Metodología, se utilizó un OD<sub>600</sub> de 0.3 y un periodo de co-cultivo de 2 d. Luego de 8 días postinoculación (dpi) no se pudo distinguir entre autofluorescencia del explante y la fluorescencia emitida por la proteína GFP. Para la segunda transformación, se utilizó un OD<sub>600</sub> de 1,0 y las muestras quedaron en medio de co-cultivo por 4 d. Esta segunda transformación fue observada en el microscopio a los 6 dpi, se distinguió la fluorescencia emitida por la expresión de la proteína GFP (Figura 7), aunque al 11 dpi, la fluorescencia del GFP se había atenuado y se apreció, nuevamente, más la autofluorescencia del explante.

Para determinar si en ambas agroinfiltraciones ocurrió edición génica, se tomaron muestras de cada grupo de transformaciones (T1, 80 dpi; T2, 12 dpi) y se realizó un análisis de PCR con las parejas de partidores CsDMR6-F1/R2, ubicados a los extremos del gen S (Figura 4 y Cuadro 3). En la Figura 7 se observa que ambas muestras, T1 y T2, amplificaron una banda cercana a 500 pb con los partidores CsDMR6-F1/R2, siendo el tamaño esperado 447 pb. Las bandas obtenidas en ambas muestras fueron clonadas y secuenciadas. T1 presentó inserción de 1 nucleótido (nt) en el sitio del gRNA2.1; mientras que T2 presentó 3 tipos de ediciones: inserción 1 nt en el sitio del gRNA2.1, una deleción en 4 nt en sitio del gRNA1.1 y una deleción según lo predicho teóricamente (Cuadro 4).



**Figura 6. Vector de Edición pVK:CsDMR6-A.**

*Arriba.* Esquema del vector de edición con los sitios de corte de la enzima de restricción BsaI, sitio de reconocimiento de la pareja de partidores gmv-CI-Fw/Rv (Morado), la proteína Cas9 (Azul), la proteína GFP (Verde) y resistencia a Kanamicina (Rosado/fucsia) y el segmento del módulo formado por la pareja de gRNA2.1 y gRNA1.1. *Abajo.* PCR de colonias de *E. coli* Survival transformadas con el vector de edición armado. La colonia 14 estaba transformada con el vector pVK:CsDMR6-A (Flecha amarilla).



**Figura 7. Detección de Edición Genética.**

*Arriba.* Microscopia de Fluorescencia de la Transformación 2 en hojas 6 dpi, en Luz FITC, GFP y Blanca.

*Abajo.* PCR de explantes transformados con partidores específicos: CsDMR6 F1-R2 (447 pb) y el partidore de gen constitutivo CsGAPc1 (80 pb). Muestras T1 y T2: Transformaciones con vector de edición; WT: *wild-type*; B: blanco.

**Cuadro 4. Alineamiento de secuencias del gen CsDMR6 editado.**

Muestra	Secuencia	Indels
<i>csdmr6</i>	TCAAATTATGGATACCAAAGTTCTGTCCTCGG-AAAAGCATTAAACAGAGGATGGATCTGGA	-
T1-A	TCAAATTATGGATACCAAAGTTCTGTCCTCGG <b>G</b> AAAAGCATTAAACAGAGGGTGGATCTGGA	+1/0
T1-B	TCAAATTATGGATACCAAAGTTCTGTCCTCGG <b>G</b> AAAAGCATTAAACAGAGGATGGATCTGGA	+1/0
T1-C	TCAAATTATGGATACCAAAGTTCTGTCCTCGG <b>G</b> AAAAGCATTAAACAGAGGATGGATCTGGA	+1/0
T2-A	TCAAATTATGGATACCAAAGTTCTGTCCTCGG-AAAAGCATTAAACAGAGGATGGATCTGGA	0/0
T2-B	TCAAATTATGGATACCAAAGTTCTGTCCTCGG <b>G</b> AAAAGCATTAAACAGAGGATGGATCTGGA	+1/0
T2-C	TCAAATTATGGATACCAAAGTTCTGTCCTCGG- <b>----</b> GCATTAAACAGAGGATGGATCTGGA	0/-4

## 6. DISCUSIÓN

EL Huanglongbing es una enfermedad que se ha ido esparciendo desde Asia hasta África y América, teniendo un gran impacto en la industria citrícola, causando grandes pérdidas financieras. Durante décadas se han realizado estudios para controlar la enfermedad, como el uso de antibióticos, pesticidas e inductores de inmunidad de la planta, así como también interrumpir la ruta de transmisión; sin embargo, no se ha podido desarrollar un método que permita eliminar el patógeno (Bassanezi *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021).

A medida que el HLB se expande y amenaza la citricultura mundial, se están buscando nuevas estrategias y tecnologías que permitan combatir o prevenir la enfermedad. La aplicación de transgenia brinda una posibilidad para el control de dicha enfermedad, como desarrollar plantas transgénicas que sobreexpresen la proteína 1 relacionada al patógeno *AtNPR1* (Dutt *et al.*, 2015); o el péptido antimicrobial *D4E1* (Caserta *et al.*, 2020), capaces de incrementar tolerancia a la enfermedad, más no volverlos resistentes a esta. Estas plantas presentan un uso limitado en mejoramiento, ya que la resistencia a la enfermedad puede ser sobrepasada por el patógeno en el tiempo; además de las restricciones de cultivo y comercialización por su condición de transgénico (Li *et al.*, 2021). Sin embargo, la inmunidad natural al HLB puede ser incrementada en cítricos aplicando la edición génica con CRISPR/Cas9, generando versiones no codificantes de genes S, que permitan interferir con los mecanismos de interacción entre la planta y el patógeno, de manera que se puedan generar plantas libres de transgenes que puedan ser comercializados (Pavan *et al.*, 2010).

Los cítricos son plantas frutales perennes de crecimiento lento, por lo tanto, es importante establecer un sistema de cultivo *in vitro* que permita una rápida micropropagación, así como también una rápida regeneración de la planta. El cultivo *in vitro* es un paso importante en el estudio y el desarrollo de plantas transformadas genéticamente, ya que un sistema de cultivo eficaz, favorece el desarrollo y proliferación de la planta con los rasgos deseados (Singh y Rayan, 2010). Durante este proyecto se estableció un medio de propagación de la especie y de regeneración de callos formados a partir de segmentos de hojas e internodos de los cultivares *wild-type* evaluados. Con respecto a la formación de callos de explantes transformados, no se logró determinar el medio de inducción de callos con la concentración de antibióticos adecuada que inhibiera el crecimiento del *Agrobacterium*, sin afectar la formación de callos.

En cuanto a la edición génica, la aplicación del sistema CRISPR/Cas9 marca un avance importante en la generación de mutaciones dirigidas y específicas en genes de distintos organismos y se ha convertido en una herramienta clave en estudios que involucran plantas, como por ejemplo en discernir la función de genes involucrados en diferentes vías metabólicas involucradas en desarrollo o, como en este trabajo, en mecanismos de respuestas a patógenos (Jia *et al.*, 2017). En este trabajo se logró desarrollar y evaluar un vector de edición compuesto por dos gRNAs y el sistema CRISPR/Cas9 capaz de reconocer e inactivar el gen *CsDMR6*, un gen de susceptibilidad relacionado al HLB.

### **6.1. Implementación del sistema de cultivo *in vitro* de *Citrus* spp.**

Un aspecto clave en la instauración de un sistema de micropropagación/regeneración *in vitro* es el paso inicial de desinfección. Para la introducción de los cultivares de estudio se utilizaron dos fuentes diferentes: una plántula de ‘Valencia’ y semillas de cultivos híbridos comerciales. Los resultados mostraron una mayor eficiencia de desinfección al utilizar como punto de partida las semillas. Como está descrito en la metodología, la semilla se encuentra expuesta a todo el proceso de limpieza y son los cotiledones los que se colocan en el medio CiSM, esto le proporcionó un ambiente aséptico y un menor contacto con los agentes desinfectantes que puedan debilitar el tejido vegetal. Por otro lado, se observó que las plántulas provenientes de una planta de invernadero, expuestas a cualquier tipo de agente biótico que puedan resistir el proceso de esterilización superficial, mostraron que su paso por etapas de desinfección afectó fuertemente su viabilidad.

Los explantes introducidos al cultivo *in vitro* y posteriormente micropropagados, no mostraron cambios del crecimiento entre los diversos medios CiSM utilizados. El crecimiento horizontal de las plántulas se puede atribuir a BAP, esta fitohormona es esencial en la regeneración de brotes y favorece la ramificación lateral de los cultivos (Bordon *et al.*, 2000). En los medios complementados con ANA se esperaba un crecimiento vertical y formación de raíces, contrario a lo descrito por da Silva Mendes *et al.* (2008), concentraciones menores de 1 mg/L de esta fitohormona pueden inducir la formación de callos en naranjas ‘Valencia’.

Para probar los medios de formación de callos, diferentes explantes WT fueron colocados en medios CiCM sin antibióticos en dos condiciones de luz diferentes. Las placas que estuvieron en oscuridad iniciaron el proceso de callificación en un corto periodo de tiempo. La condición de oscuridad para la formación de callos es importante independientemente de la variedad que se esté usando (Vacca Molina *et al.*, 2014). Sin embargo, el medio de cultivo utilizado en este trabajo no favoreció la formación de callos en ‘Valencia’, ya que, al compararla con los cultivos híbridos, presentaba una menor tasa de formación de callos.

La implementación del cultivo *in vitro* de la naranja ‘Valencia’ fue menos eficaz en comparación a los cultivares híbridos, lo que podría estar asociado al tipo de explante utilizado. No obstante, en estudios previos sobre cultivo de tejido, señalan que la variedad del cultivo influye en la respuesta morfogénica de los cítricos (Bordon *et al.*, 2000); por ende, es importante determinar la concentración y combinación de hormonas reguladoras del crecimiento específica para cada genotipo (Pexioto *et al.*, 2010; da Silva Mendes *et al.*, 2008).

### **6.2. Análisis *in silico* de genes de susceptibilidad de *Citrus* spp. frente a HLB.**

En la búsqueda de métodos biológicos para controlar la propagación del HLB, se han realizado estudios para determinar la sensibilidad de los diversos genotipos de *Citrus* ante la exposición *Ca L. asiaticus*. Estos estudios no solo han permitido comprender y clasificar los diferentes genotipos de cítricos, también han dado pie a estudios de transcritos en cítricos susceptibles y tolerantes al HLB (Folimonova *et al.*, 2009, Shokrollah *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2021) En un estudio realizado por Wang *et al.* (2016) se

analizó la expresión relativa de genes en cítricos infectados con el patógeno HLB y se observó que la expresión de cuatro genes DMR6-like era reprimida en plantas resistentes a HLB, junto con otros genes relacionados a la señalización de fitohormonas. Este comportamiento concuerda con lo descrito por Truniger y Aranda (2009), donde se señala que los patógenos gatillan la expresión de genes S para favorecer su proliferación en los cultivos. El gen *DMR6* ha sido estudiado en plantas como *Arabidopsis thaliana* y *Solanum tuberosum*, la inactivación del gen confiere resistencia ante diversos patógenos. Esta mutación no presenta cambios en el desarrollo y crecimiento de la planta; no obstante, en plantas mutantes *dmr6-dlo1*, a la cual se le inactivaron los genes *DMR6* y *DLO1* (DMR6-Like Oxigenasa 1), se produce una acumulación de ácido salicílico afectando el crecimiento de las plantas (van Damme *et al.*, 2008; Zeilmaier *et al.*, 2015, Sun *et al.*, 2016). Será importante determinar si el gen S seleccionado juega otro rol de importancia en el desarrollo de los cultivares.

### **6.3. Ensamblaje del vector de edición génica para expresar la pareja de sgRNA contra el gen definido.**

Al ser *CsDMR6* un gen de gran tamaño (6312 pb), se ensambló un vector de edición capaz de cortar la mayor parte del gen (Figura 4). Para ello, se diseñaron *in silico* parejas de gRNAs que estuvieran ubicadas a los extremos del gen en segmentos codificantes, con un mayor porcentaje de identidad. Sin embargo, en el resto del genoma de la planta pueden existir secuencias complementarias a la de los gRNAs que forman parte de la secuencia de otro gen, ya sean segmentos codificantes o en intrones, por lo tanto, para la selección de los guías se analizaron las posibles regiones *off-targets* de cada uno de los gRNAs propuestos y se eligieron que poseen la menor probabilidad de reconocer y unirse a otro segmento del ADN, de manera de no editar el gen erróneo y generar una mutación no deseada que afecte el desarrollo normal de la planta.

Al comprar los gRNAs diseñado para el gen *CsDMR6* y las secuencias de ADN de las muestras, se pudo confirmar que éstas presentaron homología con el genoma de referencia. Este resultado, sugiere que el gen *DMR6* en naranja puede ser una secuencia conservada entre algunas variedades, por lo que se puede estimar que el vector de edición diseñado sería capaz de editar el gen S en cultivares de distintas variedades. También se pudo observar una similitud de la secuencia del gen *CsDMR6* en una muestra de limón, así como también la presencia de los gRNAs y ambos juegos de partidores (Figura A4). Esto puede deberse al parentesco de los cítricos y su facilidad de hibridación entre especies. Esta información también es de relevancia, ya que da pie a la posibilidad de al desarrollar un sistema de edición que no solo sea efectiva para *Citrus sinensis*, sino también para otras especies del género *Citrus*, las cuales se ven igualmente afectadas por el HLB.

### **6.4. Evaluar la efectividad de corte del DNA blanco por parte de los editores génicos diseñados (validación) utilizando el sistema de cultivo in vitro implementado.**

Para evaluar el vector diseñado, este fue transferido a las células vegetales a través de la transformación mediada por *Agrobacterium*, utilizando la cepa EHA105, previamente descrita en trabajos con cítricos (Peng *et al.*, 2017). La diferencia en los experimentos de transformación y posterior evaluación de la emisión de GFP se puede atribuir a que se

utilizó una mayor concentración de la bacteria y los explantes estuvieron en medio de cultivo el doble del tiempo. Al analizar por PCR ambas transformaciones, se detectó una banda cercana a 500 pb en ambas indicando que el gen S pudo ser editado con el vector pVK:CsDMR6 ensamblado (Figura 7). La secuencia de los productos de PCR indicó que en ambas transformaciones hubo una inserción similar en el sitio del guía 2.1; no obstante, en la T2 se presentaron 2 ediciones más: delección en sitio del guía 1.1 y la otra edición como la predicha en el estudio *in silico*. Esta diferencia de ediciones se puede deber a la capacidad de cada célula de repararse de diferentes formas (Cheng *et al.*, 2019).

## 7. CONCLUSIONES

1. La elección del medio de cultivo es relevante al momento de cultivar diferentes genotipos de cítricos, sin embargo, es necesario determinar la concentración de fitohormonas y antibióticos ideal para cada tipo de cultivo a estudiar.
2. El gen *CsDMR6* es una secuencia conservada entre los cítricos estudiados, por lo que el vector de edición diseñado podría servir para editar distintas variedades de *Citrus*.
3. El vector de edición génica pVK:C*sDMR6*-A genera cortes en ambos extremos del gen *CsDMR6* de manera simultánea, produciendo la edición mediante la pérdida de un fragmento de dicho gen, con el cual se podría estar anulando la función del mismo.

## 8. LITERATURA CITADA

- Acha, G., R. Vergara, M. Muñoz, R. Mora, C. Aguirre, M. Muñoz, J. Kalazich and H. Prieto. 2021. A traceable DNA-replicon derived vector to speed up gene editing in potato: Interrupting genes related to undesirable postharvest tuber traits as an example. *Plants* 10(9).
- Achor, D. S., E. Etxeberria, N. Wang, S. Y. Folimonova, K. R. Chung and L. G. Albrigo. 2010. Sequence of anatomical symptom observations in *Citrus* affected with Huanglongbing disease. *Plant Pathology Journal* 9 (2): 56-64.
- Bassanezi, R. B., S. A. Lopes, M. P. de Miranda, N. A. Wulff, H. X. L. Volpe and a. J. Ayres. 2020. Overview of citrus Huanglongbing spread and management strategies in Brazil. *Tropical Plant Pathol.* 45: 251-264.
- Bordon, Y., J. Guardiola and A. Garcia-Luis. 2000. A Genotype affects the morphogenesis response in vitro of epicotyl segments of *Citrus* rootstocks. *Annals of botany* 86: 159-166.
- Caserta, R., N. Teixeira-Silva, L. Granato, S. Dorta, C. Rodrigues, L. Mitre. 2020. Citrus biotechnology: What has been done to improve disease resistance in such an important crop? *Biotechnol. Res. Innovat.* 3:95–109.
- Chen, K., Y. Wang, R. Zhang, H. Zhang and C. Gao. 2019. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annual Review of Plant Biology* 70 (1): 667-697.
- Cheng C. Z., J. W. Yang, H. B. Yan, X. J. Bei, Y. Y. Zhang, Z. M. Lu and G. Y. Zhong. 2015. Expressing *p20* hairpin RNA of *Citrus tristeza virus* confers *Citrus aurantium* with tolerance/resistance against stem pitting and seedling yellow CTV strains. *Journal of integrative agriculture* 14 (9): 1767-1777.
- Cheng C., Y. Zhang, J. Yang and Y. Zhong. 2017. Expression of hairpin RNA (hpRNA) targeting the three CTV-silencing suppressor genes confers sweet orange with stem-pitting CTV tolerance. *The Journal of Horticulture Science and Biotechnology* 95 (5): 465-474.
- Dutt, M., G. Barthe, M. Irey and J. Grosser. 2015. Transgenic Citrus Expressing an Arabidopsis NPR1 Gene Exhibit Enhanced Resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). *PLoS One* 10:e0147657
- Fraser R. S. S. 1990. The genetics of resistance to plant viruses. *Annual Rev Phytopathol* 28:179-200
- Folimonova, S. Y., C. J. Robertson, S. M. Garnsey, S. Gowda and W. O. Dawson. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99: 1346-1354.

Hajeri S., N. Killiny, C. El-Mohtar, W. Dawson, S. Gowda. 2014. *Citrus tristeza virus*-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). *Journal of Biotechnology* 176: 42-49.

Hu, Y., X. Zhong, X. Liu, B. Lou, C. Zhou, and X. Wang. 2017. Comparative transcriptome analysis unveils the tolerance mechanisms of *Citrus hystrix* in response to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection. *PLoS One* 12 (12):e0189229.

Huang, M., M.L. Roose, Q. Yu, D. Du, Y. Yu, Y. Zhang, Z. Deng, E. Stover and F.G. Jr. Gmitter. 2018. Construction of high-density genetic maps and detection of QTLs associated with Huanglongbing tolerance in citrus. *Frontiers in Plant Science* 9 (1694): 1-11.

Iqbal, M., V. Wali, P. Bakshi, K. Kour, V. Razdan, B. Sinha and K. Sood. 2019. *In vitro* propagation of *Citrus* species through callus induction and regeneration: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8 (10): 2282-2295.

Jia H., Y. Zhang, V. Orbovic, J. Xu, F.F. White and J.B. Jones. 2017. Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnology Journal* 15: 817–823.

Li X., H. Ruan, C. Zhou, X. Meng and W. Chen. 2021. Controlling Citrus Huanglongbing: Green sustainable development route is the future. *Frontier in Plant Science* 12:760481.

Lopez, C., M. Cervera, C. Fagoaga, P. Moreno, L. Navarro, R. Flores and L. Peña. 2010. Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against *Citrus tristeza virus* in transgenic Mexican lime. *Molecular Plant Pathology*. 11: 33–41.

Lu Z. J., Y. L. Huang, H. Z. Yu, N. Y. Li, Y. X. Xie, Q. Zhang, X. D. Zeng, H. Hu, A. J. Huang, L. Yi and H. N. Su. 2019. Silencing of the chitin synthase gene is lethal to the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (3734) 1: 14.

Makarova, K., Y. Wolf and E. Koonin. 2018. Classification and nomenclature of CRISPR-Cas systems: Where from here? *The CRISPR Journal* 1 (5): 325-336.

McCormac, A., M. Elliot and D. Chen. 1998. A simple method for the production of highly competent cells of *Agrobacterium* for transformation via electroporation. *Mol. Biotechnology* 9:155-159.

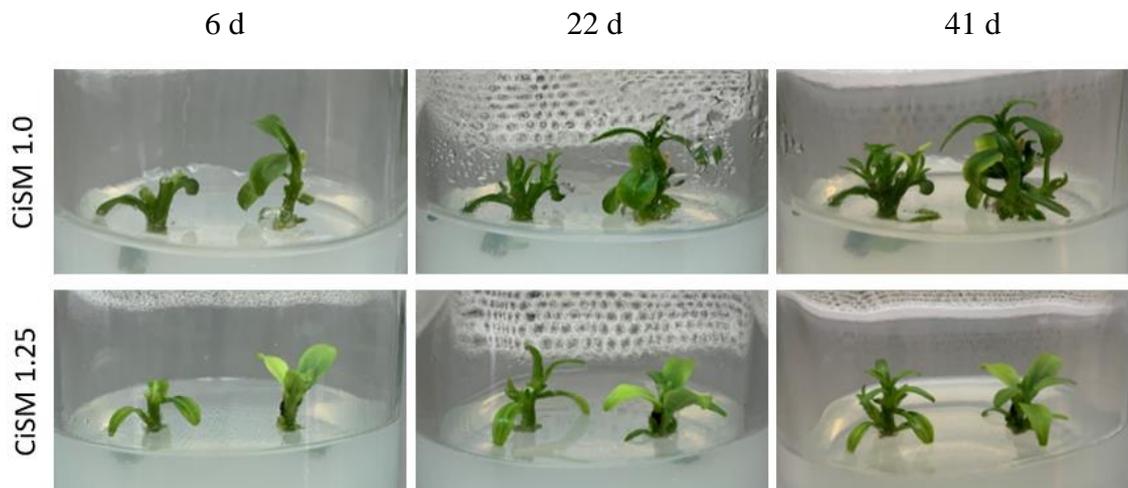
Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-97.

Pavan S., E. Jacobsen, R.G. Visser and Y. Bai. 2010. Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular Breeding* 25: 1-12.

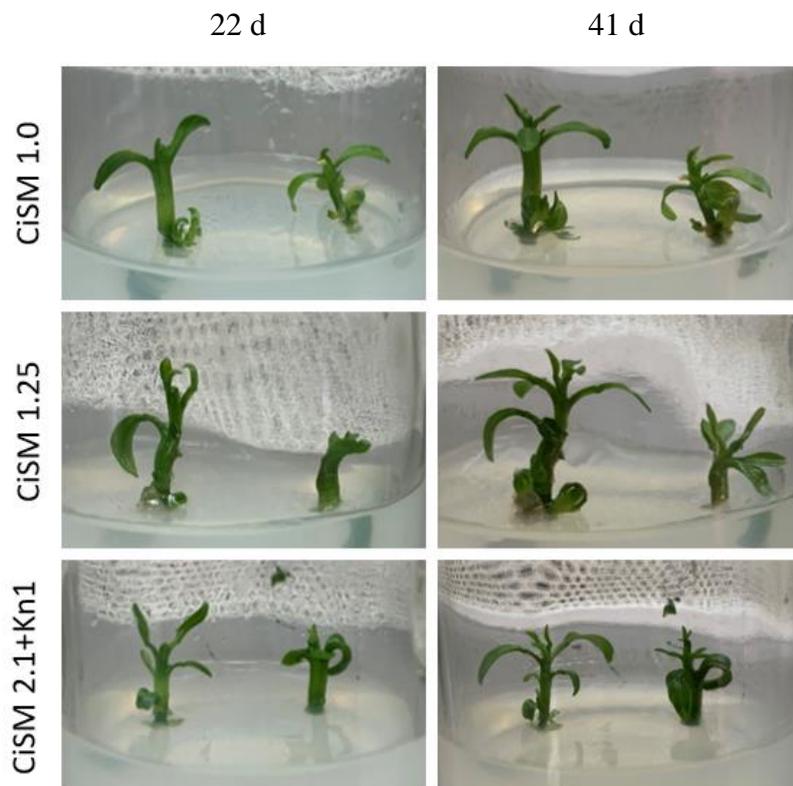
- Peng, A., S. Chen, T. Lei, L. Xu, Y. He and L. Wu. 2017. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. *Plant Biotechnology Journal* 15: 1509-1219.
- Pessina, S., L. Lenzi and M. Perazzolli. 2016. Knockdown of *MLO* genes reduces susceptibility to powdery mildew in grapevine. *Horticulture Research* 3 (16016): 1-9.
- Pexioto, M., M. Cardoso, C. Viana and W. Campos. 2010. Growth regulators, culture media and antibiotics in the in vitro shoot regeneration from mature tissue of citrus cultivars. *Pesq. Agropec. Bras*, 45 (7): 654-660.
- Ramadugu, C., M. L. Keremane, S. E. Halbert, Y. P. Duan, M. L. Roose, E. Stover and R. F. Lee. 2016. Long-term field evaluation reveals Huanlongbing resistance in *Citrus* relatives. *Plant Disease* 100 (9): 1858-1869.
- Rawat N., S. Kiran, D. Dongliang, F. Gmitter Jr. and Z. Deng. 2015. Comprehensive meta-analysis, co-expression and miRNA nested network analysis identifies gene candidates in citrus against Huanglongbing disease. *BMC Plant Biology* 15 (184): 1-21.
- Rodríguez-Hernández A. M., B. Gosalvez, R. N. Sempere, L. Burgos, M. A. Aranda and V. Truniger. 2012. Melon RNA interference (RNAi) lines silenced for Cm-eIF4E show broad virus resistance. *Molecular Plant Pathology* 13: 755–763.
- Schmitt-Keichinger C. 2019. Manipulating cellular factors to combat viruses: A case study from the plant eukaryotic translation initiation factors eIF4. *Frontiers in Microbiology* 10 (17): 1-8.
- Shokrollah, H., T. L. Abdullah, K. Sijam, S. N. A. Abdullah and N. A. P. Abdullah. 2009. Differential reaction of citrus species in Malaysia to Huanglongbing (HLB) disease using grafting method. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 4 (1): 32-38.
- da Silva Mendes, A. F., L. Cardoso Cidade, G. Novais Manzoli, W. Campos Otoni, W. dS. Soares Filho and M. G. Cardoso Costa. 2008. Tissue culture parameters in sweet Orange cultivars. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 43 (8): 1093-1096.
- Singh, S. and M. V. Rajam. 2010. Highly Efficient and Rapid Plant Regeneration in *Citrus sinensis*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 19 (2): 195-202.
- Steenkamp, J., I. Wild, A. Lourens and P. Van Helden. 1994. Improved method for DNA extraction from *Vitis vinifera*. *American Journal of Enology and Viticulture* 45: 102-106.
- Sun K., A.-M. Wolters, J. Vossen, M. Rouwet, A. Loonen, E. Jacobsen, R. Visser and Y. Bai. 2016. Silencing of six susceptibility genes result in potato late blight resistance. *Transgenic Res* 25: 731-742.

- Truniger V and M.A. Aranda. 2009. Recessive resistance to plant viruses. Natural and Engineered Resistance to Plant Viruses, Part I, 119-231.
- Vacca Molina, M., M. L. C. Bonomo, Z. Avilés and L. Díaz. 2014. Inducción de callos embriogénicos y formación de preoembriones somáticos en *Pterogyne nitens* Tull “tipa colorada”. Revista Colombiana Biotecnológica 16 (2): 194-203.
- Van Damme, M., R. huibers, J. Elberse and G. Van-den.Ackeryeken, 2008. Arabidopsis DMR6 encodes a putative 2OG-Fe (II) oxygenase that is defense-associatedn but required for susceptibility to downy mildew. Plant J. 54: 785-793.
- Wang X, S. E. Kohalmi, A. Svircev, A. Wang, H. Sanfaçon, L. Tian. 2013. Silencing of the host factor eIF(iso)4E gene confers plum pox virus resistance in plum. PloS One 8 (1): e50627.
- Wang, Y., L. Zhou, X. Yu, E. Stover, F. Luo and Y. Duan. 2016. Transcriptome profiling of Huanglongbing (HLB) tolerant and susceptible *Citrus* plants reveals the role of basal resistance in HLB tolerance. Frontiers in Plant Science 7 (933): 1-13.
- Xing H. L., L. Dong, Z. P. Wang, H. Y. Zhang, C. Y. Han, B. Liu, X. C. Wang and Q. J. Chen. 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. BMC Plant Biology, 14 (27): 1-12.
- Yin, K., T. Han, G. Liu, T. Chen, Y. Wang and A. Yu. 2015. A geminivirus based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. Scientific Reports 5 (14926): 1-10.
- Yu, X., S. Gowda and N. Killiny. 2017. Double stranded RNA delivery through soaking, mediates silencing of the muscle protein 20 and increases mortality to the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. Pest Management Science 73 (9): 1846-1853.
- Zaidi, S. S., and S. Mansoor. 2017. Viral vectors for plant genome engineering. Frontiers in Plant Science 8 (539): 1-10.
- Zeilmaker, T., N. Ludwig, J. Elberse, M. Seid, L. Berke, A. Van Doorn, R. Schuurink, S. Berend and G. Van den Ackerveke. 2015. Downy Mildew Resistant 6 and DMR6-like oxygenase 1 are patially redundant but distinct suppressors of immunity in Arabidopsis. The Plant Journal 81: 210-222.

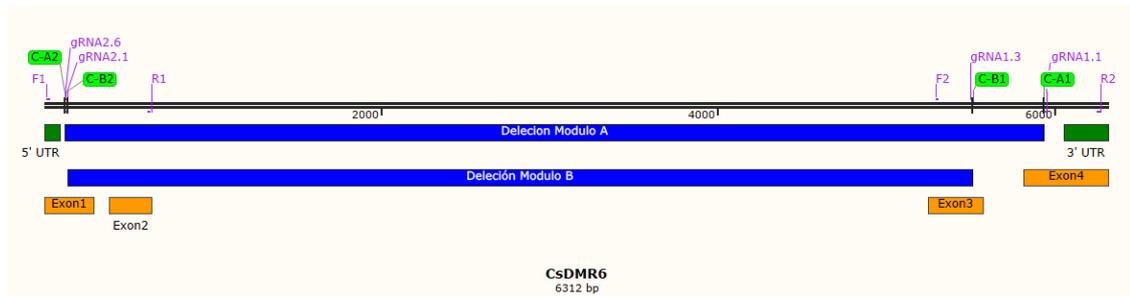
## 9. APÉNDICES



**Figura A1. Micropropagación del cultivo comercial CsH1.** Naranja dulce micropropaga en medio MS complementado con 30 g/L sacarosa y hormonas. CiSM1.0: BAP 1,0 mg/L; CiSM1.25: BAP 1,0 mg/L y ANA 0,25 mg/L



**Figura A2. Micropropagación del cultivo comercial CsH2 en diferentes medios CiSM.** Micropropagación de la naranja en medio MS complementado con 30 g/L sacarosa y hormonas, a los 22 d y 41 d. Arriba: BAP 1,0 mg/L; Centro: BAP 1,0 mg/L y ANA 0,25 mg/L; Abajo: BAP 2,0 mg/L, ANA 0,1 mg/L y Kn 1,0 mg/L.



**Figura A3. Esquema de genes CsDMR6 en *C. sinensis*.** Se distinguen los sitios de amplificación de cada uno de los partidores y gRNAs (Color morado), los sitios de corte (verde) y las posibles deleciones en el gen (barras azules). Esquema diseñado con el programa SnapGene Viewer.

```

                                120      130      140      5930      5940      5950      5960
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CsDMR6_F1R1  TTCTGTCTCGGGAAATCCGGTACACAAACTTGCC//ATCAGCCCTCCAAAAGCATTAACAGAGGATGGATC
Cs_Valencia TTCTGTCTCTCGGGAAATCCGGTACACAAACTTGCC//ATCAGCCCTCCAAAAGCATTAACAGAGGATGGATC
Limón_Híbrido TTCTGTCTCTCGGGAAATCCGGTACACAAACTTGCC//ATCAGCCCTCCAAAAGCATTAACAGAGGATGGATC

```

**Figura A4. Alineamiento de secuencias de gRNAs en *C. sinensis* y *Citrus x limon*.** Comparación de las secuencias de *C. sinensis* 'Valencia' y limón híbrido en comparación al *CsDMR6* genómico. La secuencia del gRNA2.1 (120 nt) y del gRNA1.1 (5934 nt) se encuentra subrayadas en negrita; la secuencia PAM, en negrita cursiva; y la homología entre las secuencias, en sombreado gris.

**Cuadro A1. Parejas de gRNAs seleccionados para la edición del gen *DMR6* en *C. sinensis*.**

Gen	Módulo	sgRNA	Secuencia	Delección
CsDMR6	A	sgRNA 1.1	CCTCTGTTAATGCTTTTGGGA	5814 pb
		sgRNA 2.1	GTTTGTGTACCGGATTCCCG	
	B	sgRNA 1.3	AGTTCTCAAAGACGACAAAT	5376 pb
		sgRNA 2.6	AATCCGGTACACAAACTTGC	