



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

---

Sandra Sopalda Prince

Investigadores:

Dr. Humberto Prieto, Dr. Ricardo Vergara

14 octubre 2022

# El Huanglongbing

Causado por proteobacterias

***Candidatus Liberibacter* (spp):**

- *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. africanus*, *Ca. L. americanus*

Parásito obligados en el floema.

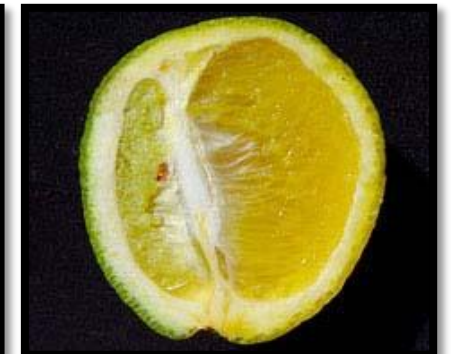
- Taponamiento generados por acumulación de calosa y p-proteínas

## • Medidas de Control

- Tratamientos con insecticidas
- Producción de plantas sanas
- Injertos con plantas resistentes o tolerancia
- Remover las plantas infectada con HLB



*Diaphorina citri*



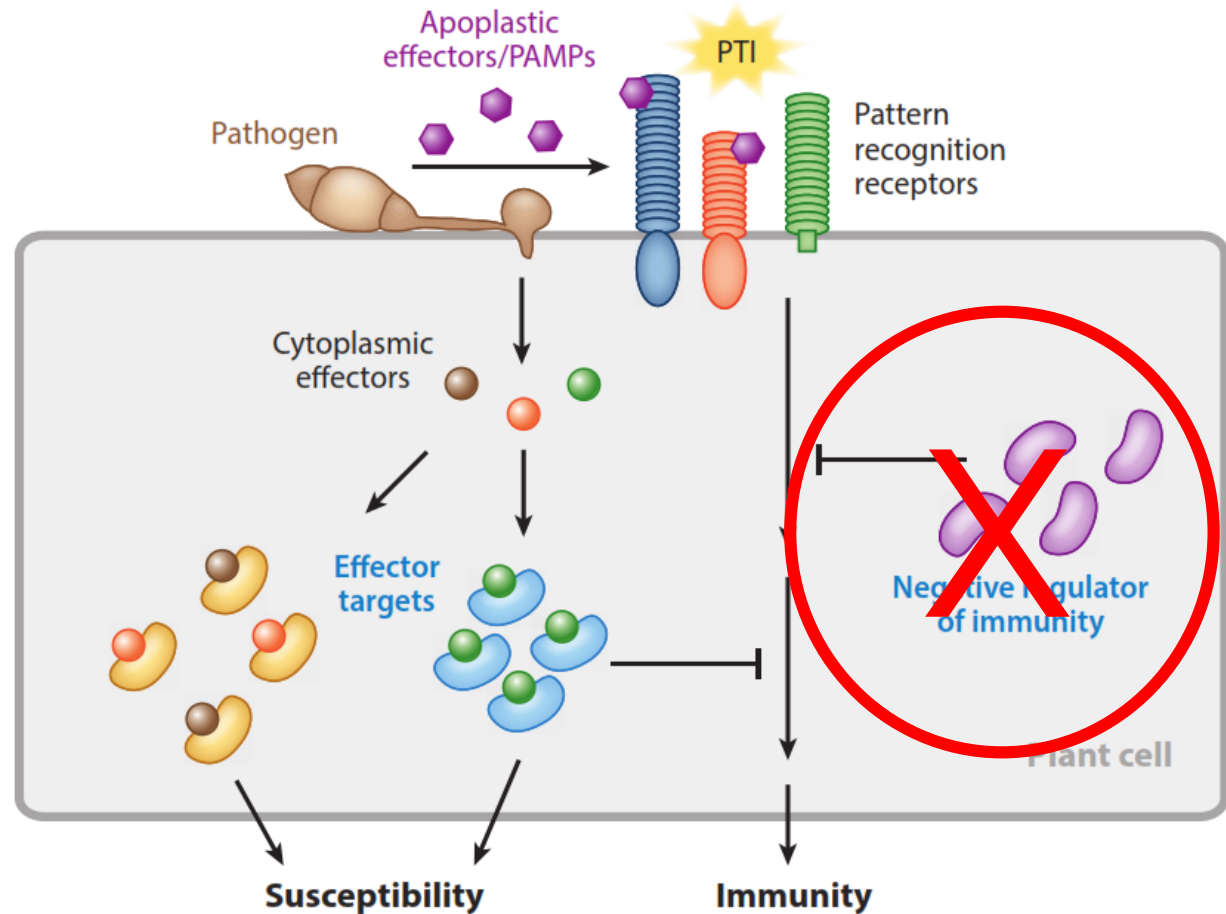
# Genes de susceptibilidad

## Propician la enfermedad

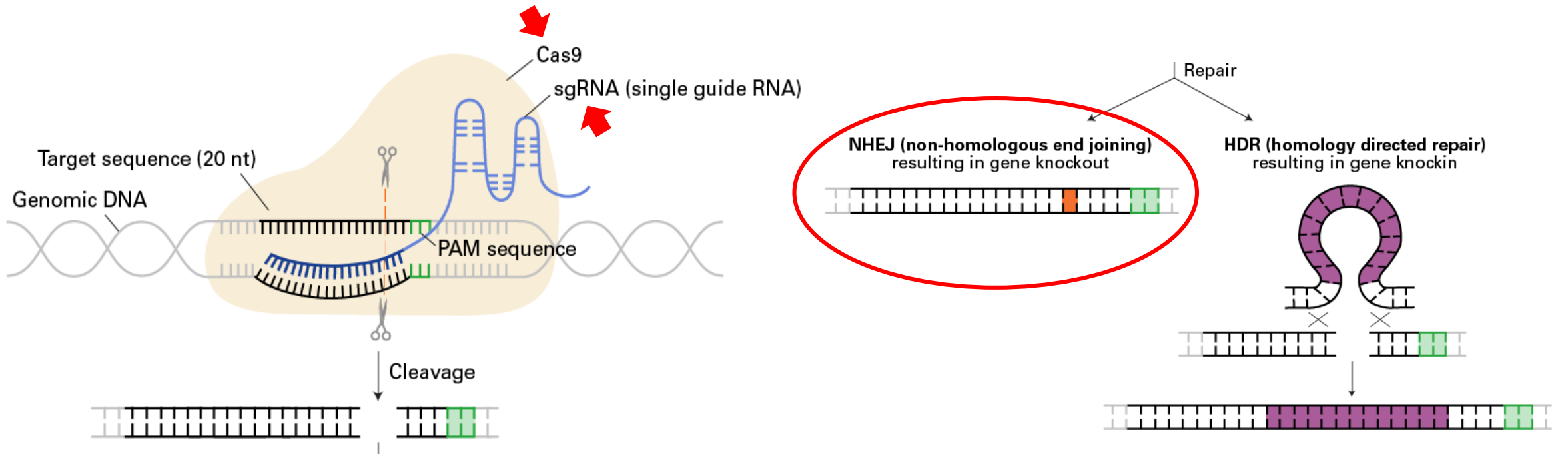
- Facilitadoras del proceso de infección.

## Mutación génica

- Resistencia recesiva



# Sistema CRISPR/Cas



# 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 en *Citrus* spp.

# Objetivos Específicos

1. Implementar un sistema de cultivo *in vitro* de *Citrus* spp. que permita evaluar la edición génica en la especie.
- Desarrollar vectores de edición génica para expresar parejas de RNA guías contra el gen S definido.
- Evaluar la capacidad de inactivación por corte de los editores génicos diseñados utilizando el sistema de cultivo *in vitro* implementado.

IMPLEMENTAR UN SISTEMA DE CULTIVO *IN VITRO* DE *CITRUS* SPP. QUE PERMITA EVALUAR LA EDICIÓN GÉNICA EN LA ESPECIE

---

Objetivo Específico 1

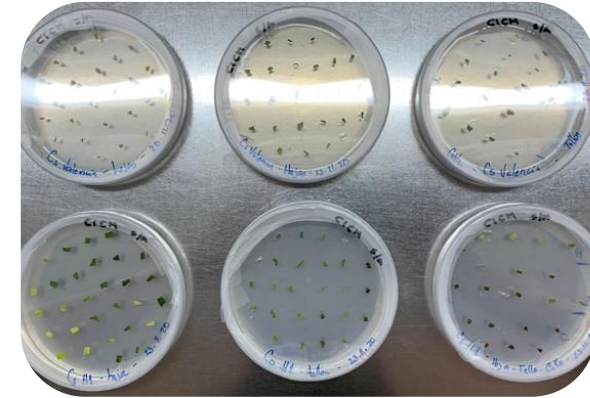
# Sistema de cultivo *in vitro* de *Citrus* spp



Introducción *in vitro*



Establecimiento y Micropropagación



Formación de Callos

Fitohormona	CiSM1.0	CiSM1.25	CiSM2.1+KN1	CiSM1+GA
	mg/L			
BAP	1,0	1,0	2,0	1,0
ANA		0,25	0,1	
KN			1,0	
GA <sub>3</sub>				1,0

Medio CiCM:

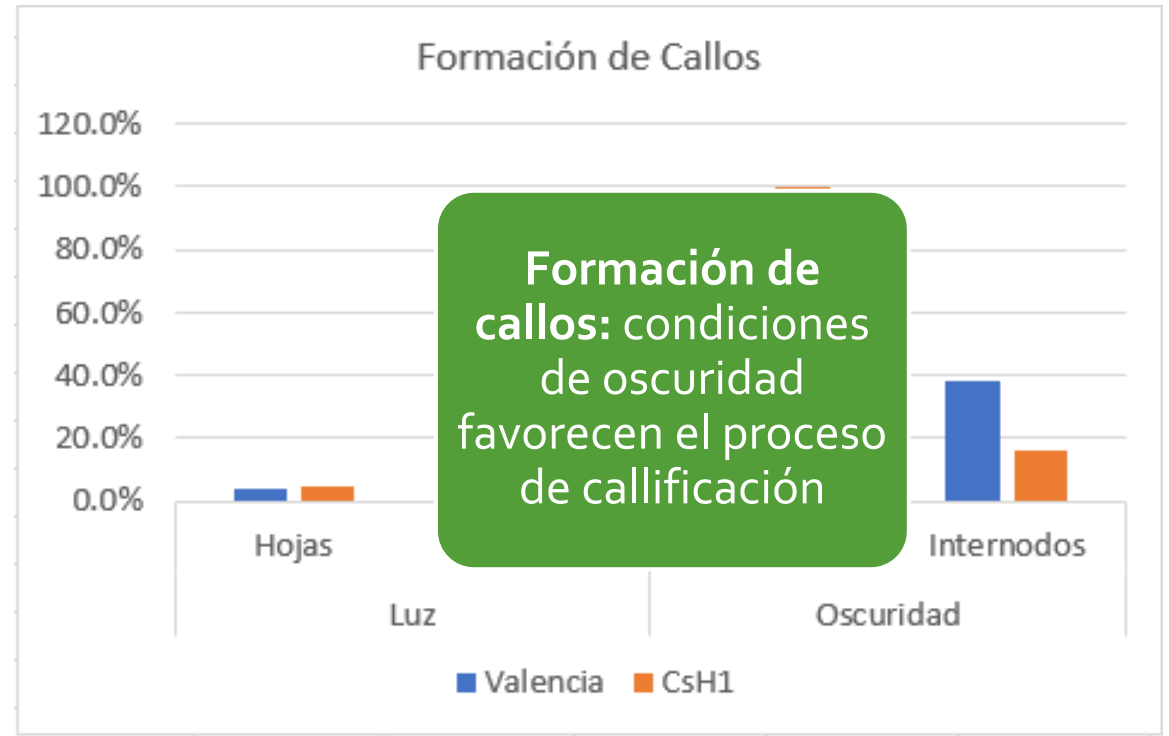
- MES 0.5 g/L
- BAP: 3 mg/L
- 2,4D: 1 mg/L
- NAA: 0.1 mg/L

Fotoperiodo: 16 h Luz/8 h oscuridad; 30 d oscuridad

# Micropropagación de *C. sinensis*

# Formación de Callos

CiSM<sub>1</sub>+GA<sub>3</sub> 1.0



Determinar la concentración de fitohormonas y condiciones ideales para cada tipo de cultivo a estudiar



# DESARROLLAR VECTORES DE EDICIÓN GÉNICA PARA EXPRESAR PAREJAS DE RNA GUÍAS CONTRA EL GEN S DEFINIDO

---

Objetivo Específico 3

# Gen *Downy Mildew Resistance 6*

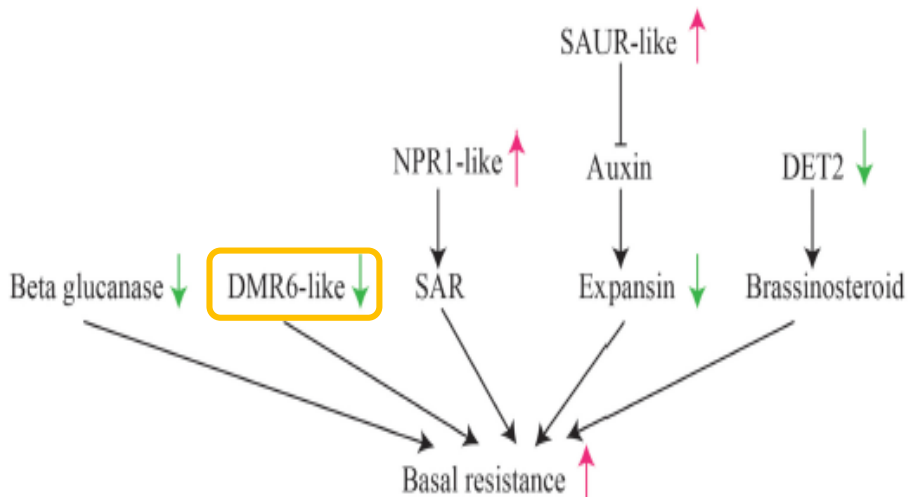
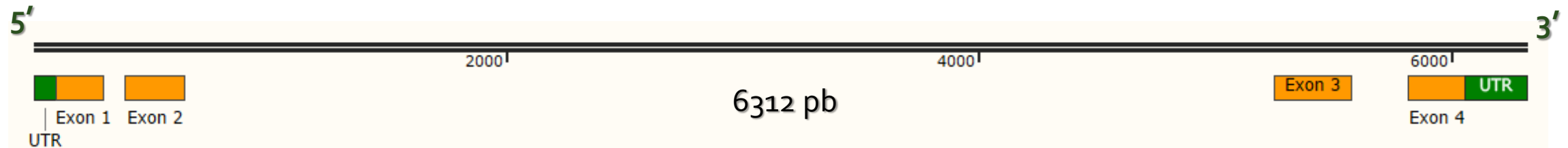


FIGURE 7 | Illustration of suppression/activation of multiple pathways in HLB tolerant "Jackson" citrus trees compared to HLB susceptible "Marsh" trees.

Familia de Oxigenasas, 2-oxoglutarato Fe(II) dependiente

Gen represor de la inmunidad de la planta

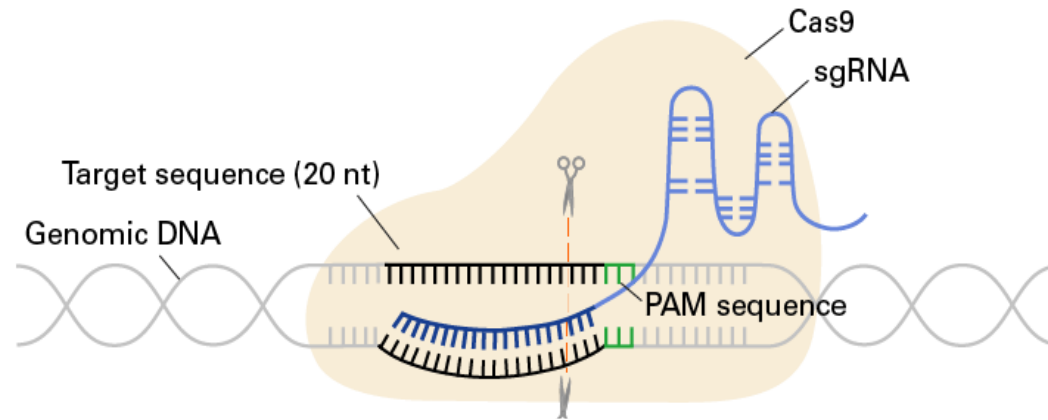
Inactivación del gen confiere resistencia ante diversos patógenos.

- *Arabidopsis thaliana*
- *Solanum tuberosum*
- *Solanum lycopersicum*

Diseñar los gRNAs

Analizar las secuencias

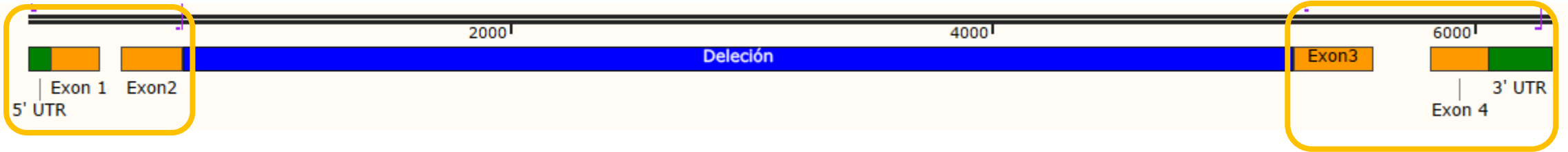
Ensamblar el vector



# Diseñar los gRNAs

# Analizar las secuencias

# Ensamblar el vector



ID	chr	start	end	str	sgRNA_1+PAM	score	start	end	str	sgRNA_2+PAM	score	paired score	distance
unknown1(1)	scaffold00343	79264	79286	-	AGTTCTCAAAGACGACAAATGGG	0.434	84647	84669	+	GTTTGTGTACCGGATCCCGAGG	0.845	1.279	5361
unknown1(2)	scaffold00343	79366	79388	+	GCTCTGGCTCTGGACATGGTGGG	0.412	84647	84669	+	GTTTGTGTACCGGATCCCGAGG	0.845	1.257	5259
unknown1(3)	scaffold00343	79264	79286	-	AGTTCTCAAAGACGACAAATGGG	0.434	84636	84658	-	CGGTACACAAACTTGCCGGAGGG	0.807	1.241	5350
unknown1(4)	scaffold00343	79356	79378	-	CCAGAGCCAGAGCTTACTTATGG	0.376	84647	84669	+	GTTTGTGTACCGGATCCCGAGG	0.845	1.221	5269
unknown1(5)	scaffold00343	79366	79388	+	GCTCTGGCTCTGGACATGGTGGG	0.412	84636	84658	-	CGGTACACAAACTTGCCGGAGGG	0.807	1.219	5248
unknown1(6)	scaffold00343	78998	79020	-	GGCTTATTATCAATATTCATCGG	0.366	84647	84669	+	GTTTGTGTACCGGATCCCGAGG	0.845	1.211	5627
unknown1(7)	scaffold00343	78903	78925	-	TTGTGAATGCTGAAAAGGCAAGG	0.348	84647	84669	+	GTTTGTGTACCGGATCCCGAGG	0.845	1.193	5722
unknown1(8)	scaffold00343	79356	79378	-	CCAGAGCCAGAGCTTACTTATGG	0.376	84636	84658	-	CGGTACACAAACTTGCCGGAGGG	0.807	1.183	5258
unknown1(9)	scaffold00343	79297	79319	-	TTTATTGCAAGATTAGAAGTGG	0.332	84647	84669	+	GTTTGTGTACCGGATCCCGAGG	0.845	1.177	5328
unknown1(10)	scaffold00343	78998	79020	-	GGCTTATTATCAATATTCATCGG	0.366	84636	84658	-	CGGTACACAAACTTGCCGGAGGG	0.807	1.177	5328
unknown1(11)	scaffold00343	79455	79477	-	GAATTAATATCAGAGAGCTTAGG	0.324	84647	84669	+	GTTTGTGTACCGGATCCCGAGG	0.845	1.177	5328
unknown1(12)	scaffold00343	79362	79384	+	GTAAGCTCTGGCTCTGGACATGG	0.322	84647	84669	+	GTTTGTGTACCGGATCCCGAGG	0.845	1.177	5328
unknown1(13)	scaffold00343	78903	78925	-	TTGTGAATGCTGAAAAGGCAAGG	0.348	84636	84658	-	CGGTACACAAACTTGCCGGAGGG	0.807	1.177	5328
unknown1(14)	scaffold00343	79297	79319	-	TTTATTGCAAGATTAGAAGTGG	0.332	84636	84658	-	CGGTACACAAACTTGCCGGAGGG	0.807	1.177	5328
unknown1(15)	scaffold00343	79229	79251	+	AATGACAAAGGCATTAGGAAGGG	0.288	84647	84669	+	GTTTGTGTACCGGATCCCGAGG	0.845	1.177	5328

-- Off targets --

gRNA 1				gRNA 2			
Chr	Sequence	% GC	off-targets	Chr	Sequence	% GC	off-targets
scaffold00343	AGTTCTCAAAGACGACAAAT	35.0	0,0,0,0,15	scaffold00343	CGGTACACAAACTTGCCGGGA	55.0	0,0,0,5,12

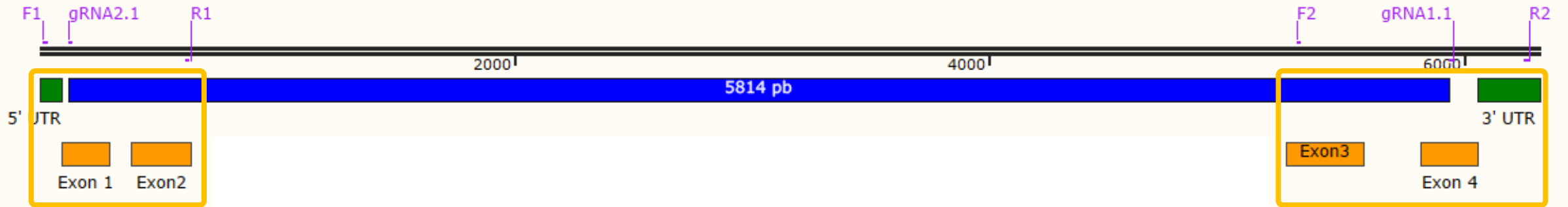
No off-targets with less than 4 mismatches were found

Chr	Sequence	Str	Position	Location
scaffold00252	CGGTACACA TACTTGG GGA	-	88351	intergenic
scaffold00739	CGGTACACA TACTTGG GGA	-	70119	intergenic
scaffold00761	CGGTACACA TACTTGG GGA	-	5093	intergenic
scaffold02714	CGGTACACA TACTTGG GGA	-	3113	intergenic
scaffold04589	CGGTACACA TACTTGG GGA	+	4426	intergenic

Diseñar los gRNAs

Analizar las secuencias

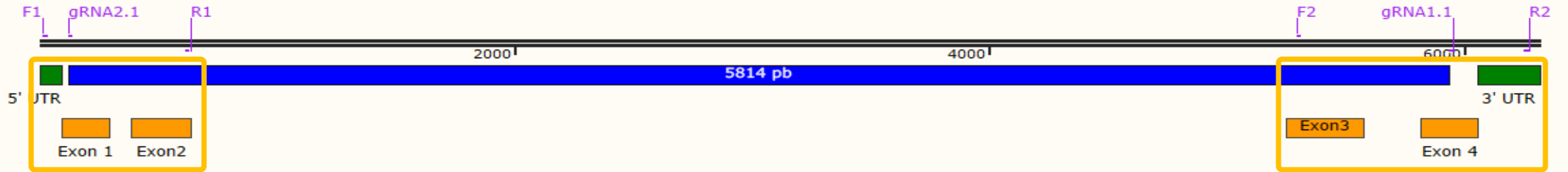
Ensamblar el vector



Diseñar los gRNAs

Analizar las secuencias

Ensamblar el vector



	120	130	140	5930	5940	5950	5960
CsDMR6	TTCTGT	CCTCGGGAATCCGGTACACAAA	CTTGCC	//	ATCAG	CCCTCCAAAAGCATTAAACAGAG	GATGGATC
Cs Valencia	TTCTGT	CCTCGGGAATCCGGTACACAAA	CTTGCC	//	ATCAG	CCCTCCAAAAGCATTAAACAGAG	GATGGATC
Cs Híbrido1	TTCTGT	CCTCGGGAATCCGGTACACAAA	CTTGCC	//	ATCAG	CCCTCCAAAAGCATTAAACAGAG	GATGGATC
Cs Híbrido2	TTCTGT	CCGCGGGAATCCGGTACACAAA	CTTGCC	//	ATCAG	CCCTCCAAAAGCATTAAACAGAG	GATGGATC
Cs Híbrido3	TTCTGT	CCGCGGGAATCCGGTACACAAA	CTTGCC	//	ATCAG	CCCTCCAAAAGCATTAAACAGAG	GATGGATC

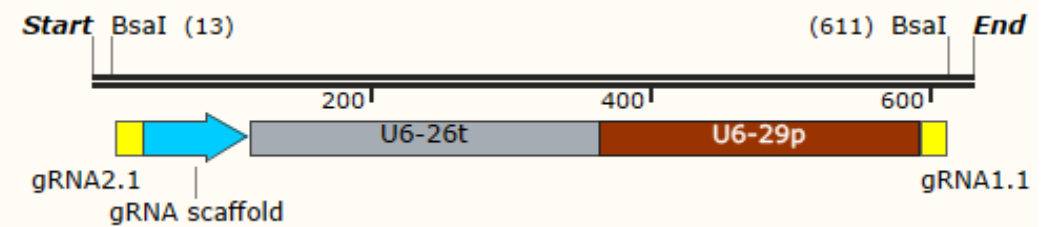
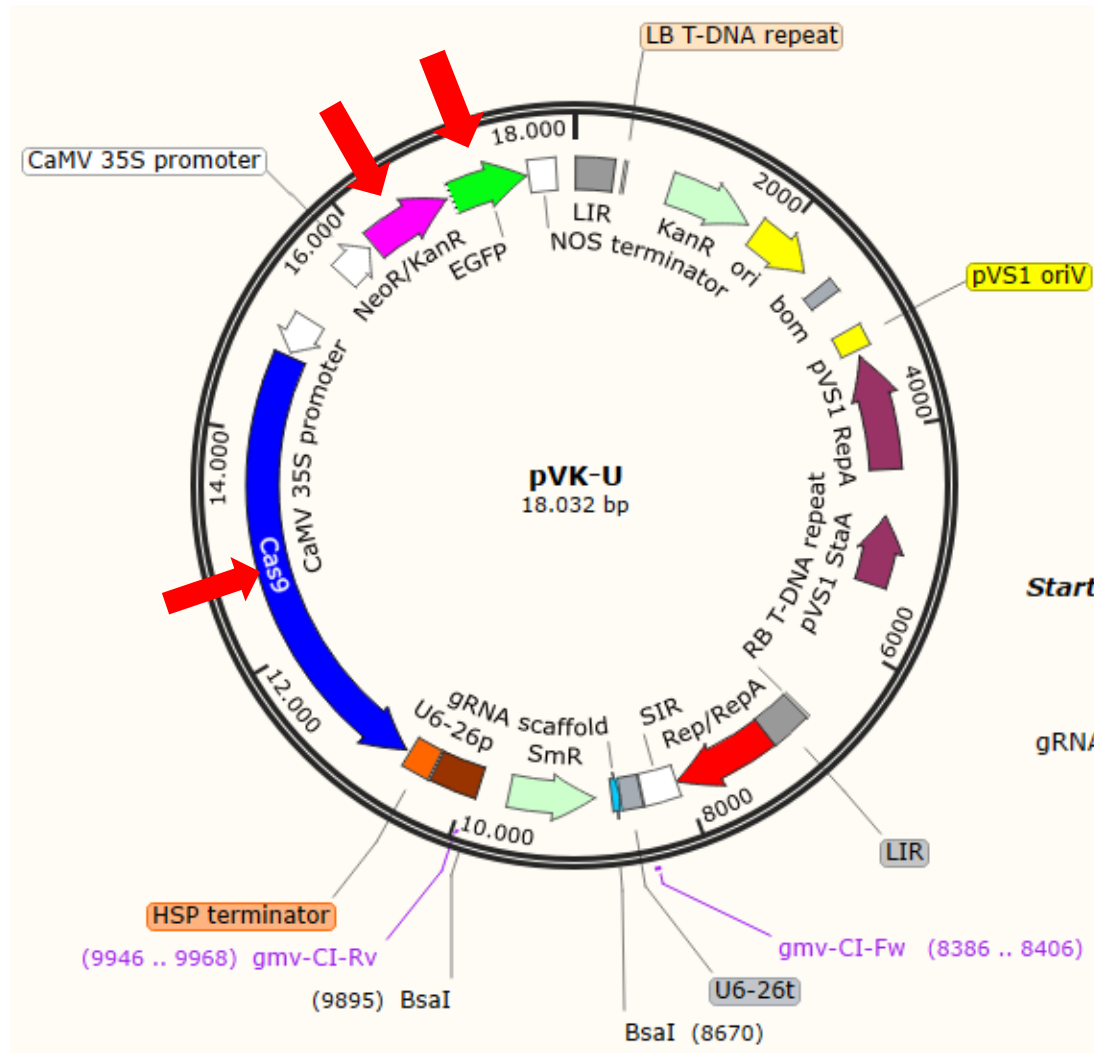
PAM gRNA2.1 PAM gRNA1.1

El gen CsDMR6 es una secuencia conservada entre los genotipos estudiados.

Diseñar los gRNAs

Analizar las secuencias

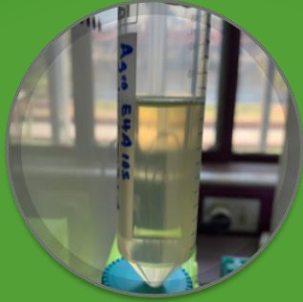
Ensamblar el vector



EVALUAR LA CAPACIDAD DE INACTIVACIÓN  
POR CORTE DE LOS EDITORES GÉNICO  
DISEÑADOS UTILIZANDO EL SISTEMA DE  
CULTIVO IN VITRO IMPLEMENTADO



# Agroinfiltración



*A. tumefaciens*  
EHA105 :  
pVK:CsDMR6-A

OD<sub>600</sub>: 0,3-0,5

OD<sub>600</sub>: 1



Cortar los  
explante y  
colocarlos en  
CiCM.L



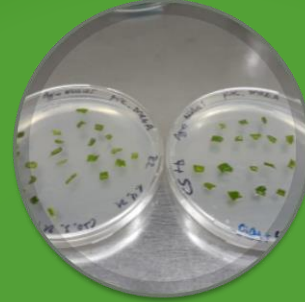
Colocar los  
explantes en la  
solución con  
*Agrobacterium*



Dejarlos en  
medio de  
CoCultivo  
durante

2d

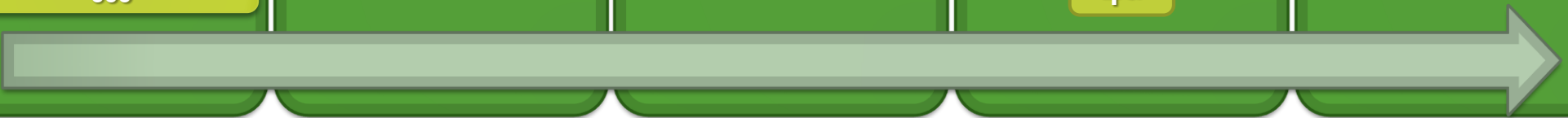
4d



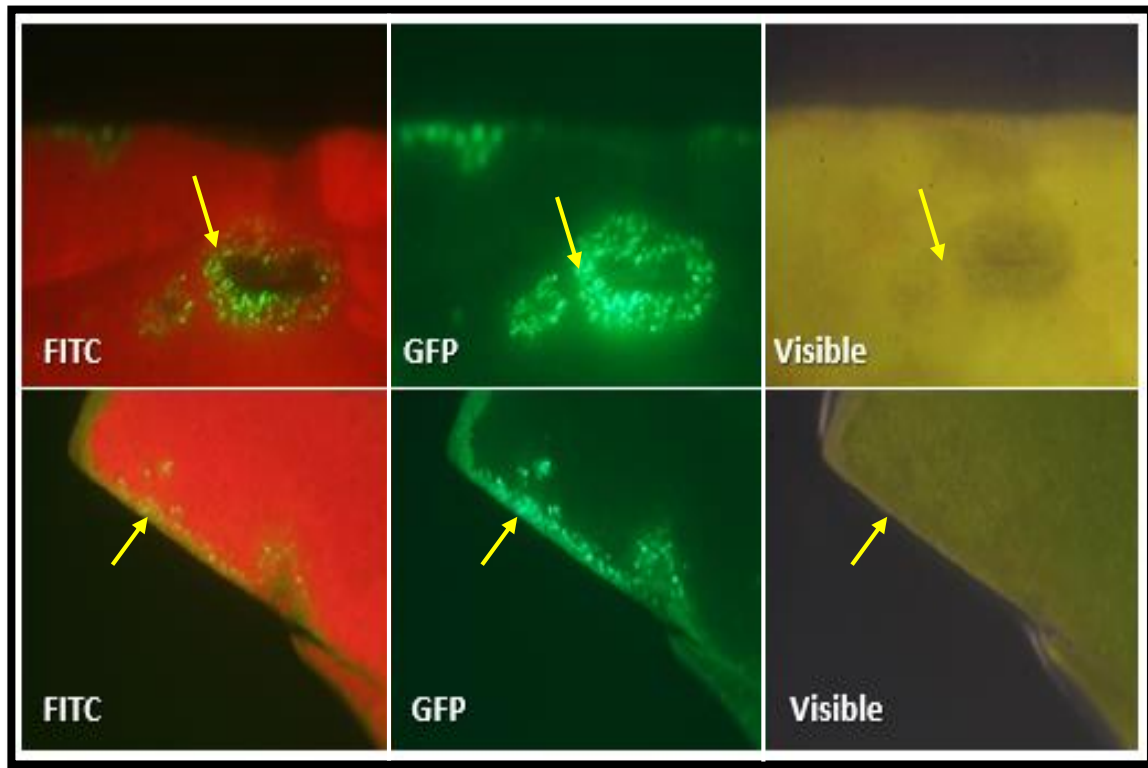
Lavado de los  
explantes,  
transferir a CiCM

T<sub>1</sub>

T<sub>2</sub>

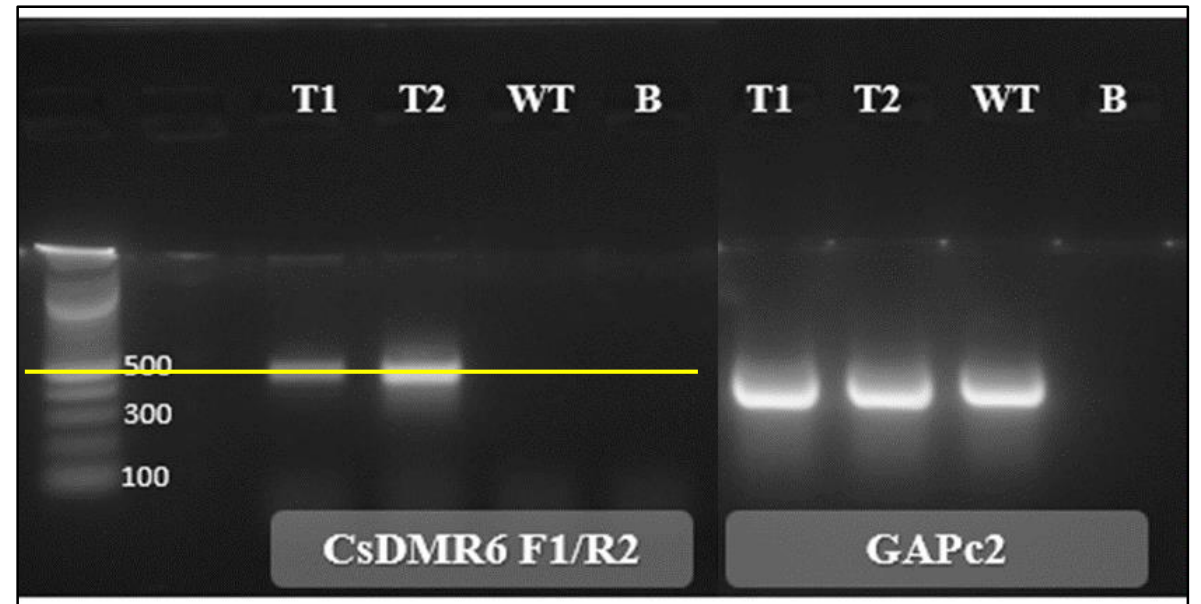
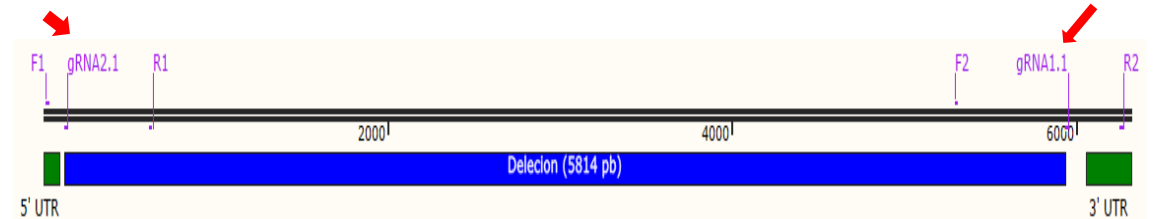


# Microscopia de fluorescencia



T<sub>2</sub>, 6dpi

# PCR de explantes transformados



Gen CsDMR6: 6312 pb  
Gen Editado : 447 pb

# Secuencias gen editado por doble corte

5814 pb

100    110    120    130    140    //    5930    5940    5950    5960    nt

CsDMR6 genómico	TTATGGATACCAAAGTTCTGT <u>CCTCGGGAATCCGGTACACAA</u> ACTTGCC // ATCAGC <u>CTCCAAAAGCATTAACAGAG</u> GATGGATCTGGAG	wt
CsDMR6 editado	TTATGGATACCAAAGTTCTGT <u>CCTCGG</u> ~~~~~AAAAGCATTAAACAGAGGATGGATCTGGAG	0/0
T1-A	TTATGGATACCAAAGTTCTGT <u>CCTCGG</u> G~~~~~AAAAGCATTAAACAGAGGGTGGATCTGGAG	+1/0
T1-B	TTATGGATACCAAAGTTCTGT <u>CCTCGG</u> G~~~~~AAAAGCATTAAACAGAGGATGGATCTGGAG	+1/0
T1-C	TTATGGATACCAAAGTTCTGT <u>CCTCGG</u> G~~~~~AAAAGCATTAAACAGAGGATGGATCTGGAG	+1/0
T2-A	TTATGGATACCAAAGTTCTGT <u>CCTCGG</u> ~~~~~AAAAGCATTAAACAGAGGATGGATCTGGAG	0/0
T2-B	TTATGGATACCAAAGTTCTGT <u>CCTCGG</u> G~~~~~AAAAGCATTAAACAGAGGATGGATCTGGAG	+1/0
T2-C	TTATGGATACCAAAGTTCTGT <u>CCTCGG</u> ~~~~~ <u>      </u> GCATTAAACAGAGGATGGATCTGGAG	0/-4

El vector de edición génica pVK:CsDMR6-A diseñado generó cortes en los sitios señalados por la pareja de gRNAs.

# Conclusiones

El 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.

El gen *CsDMR6* es una **secuencia altamente conservada entre los cítricos estudiados**, por lo que el vector de edición diseñado podría servir para editar distintas variedades de *Citrus*.

El vector de edición génica pVK:C*sDMR6*-A genera **cortes en ambos extremos del gen *CsDMR6* de manera simultanea**, produciendo la edición mediante la pérdida de un fragmento de dicho gen, con el cual se podría estar anulando la función del mismo.



- Proyecto de SENACYT FID18-050
- Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Agropecuarias - La Platina.
- Laboratorio Agrobiotecnología, Instituto de Innovaciones Agropecuarias de Panamá.
- Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, Universidad de Chile.

