

EDICIÓN DEL GENOMA DE *CITRUS AURANTIFOLIA* CON POTENCIAL PARA GENERAR VARIEDADES RESISTENTES A INFECCIÓN POR BACTERIAS

Alejandra Dagmara Rivera López¹, Berenice Calderón Pérez^{1,2}, Leandro Alberto Núñez Muñóz¹, Roberto Ruíz Medrano¹, Beatriz Xoconostle Cázares¹. 1. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Av. IPN 2508, San Pedro Zacatenco, Ciudad de México, C.P. 07360. 2. Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Carretera Federal Pachuca - México Km 37.5, Tecamac, Estado de México, C.P. 55740. beatriz_xoconostle@yahoo.com

Palabras clave: *Huanglongbing*, *Citrus aurantifolia*, biobalística

Introducción. México es líder en producción de cítricos, al ubicarse como el quinto productor a nivel mundial (SAGARPA, 2017). Sin embargo, la producción de cítricos se ha visto afectada por la presencia de plagas y enfermedades, entre las que destaca Huanglongbing (HLB), reconocida como la enfermedad más devastadora que ha amenazado la producción de cítricos a nivel global (Bové & de Barros, 2006; Gottwald *et al.*, 2010), causada por la bacteria Gram(-) *Candidatus Liberibacter asiaticus*, una α -proteobacteria transmitida por psílidos y limitada al tejido vascular (Gottwald *et al.*, 2010). En este proyecto se propone como estrategia para combatir esta enfermedad, el uso de péptidos antimicrobianos endógenos de la planta, fusionados a la proteína CsPP16, que media el transporte supracelular al interactuar con plasmodesmos y permitir el movimiento célula a célula y a larga distancia en el floema (Xoconostle-Cázares, 1999). La edición del genoma de *Citrus aurantifolia* para expresar antimicrobianos supracelulares se realizó con el sistema CRISPR/Cas9. Así, la defensina podría transportarse a los haces vasculares, donde habita la bacteria, mitigando o controlando su propagación.

Metodología. Se identificó mediante el análisis *in silico* del genoma de *C. aurantifolia* a la defensina P322, estructuralmente semejante a la beta defensina de humano. Posteriormente, se diseñó el plásmido de recombinación homóloga, conteniendo al gen CsPP16 fusionado a la P322. Con base en el análisis de la región del promotor del gen CsPP16, se diseñó y generó el vector de expresión de Cas9 y dos RNA guías (gRNAs) dirigidos hacia las regiones no codificantes 5' y 3' del gen CsPP16 de *C. aurantifolia*. Finalmente, se transformaron por biobalística explantes de epicotilo de *C. aurantifolia* con el plásmido de expresión de Cas9 y el templado de recombinación homóloga, siguiendo el método descrito por Wu *et al.*, 2016.

Resultados. Mediante el diseño de oligonucleótidos específicos de las diferentes regiones se realizó un ensamblaje para obtener la construcción ilustrada en la Fig. 1.

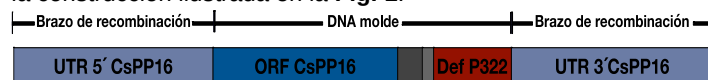


Fig. 1 Construcción del templado de recombinación homóloga.

Se diseñaron dos gRNAs empleando la secuencia del gen CsPP16 de *C. aurantifolia*, cada uno se clonó de manera independiente en el vector de expresión pBUN4U6SM y se realizó un ensamblaje de dos unidades transcripcionales conformadas por los gRNAs flanqueados por el promotor y terminador U6, como se muestra en la Fig. 2 El ensamblaje se

clonó en el vector de expresión de Cas 9 pBUN4U6SM por restricción con HindIII.

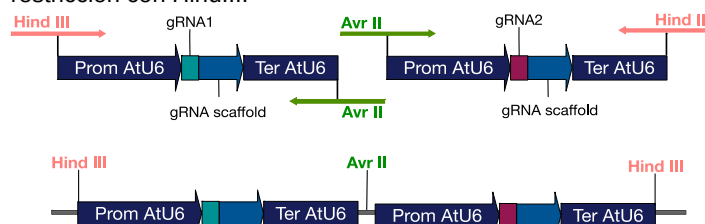


Fig. 2 Ensamblaje de las dos unidades transcripcionales con los gRNAs, usando oligonucleótidos específicos.

Posteriormente, se bombardearon los extremos terminales de los explantes de *C. aurantifolia* con partículas de oro recubiertas con los plásmidos generados. **Fig. 3**

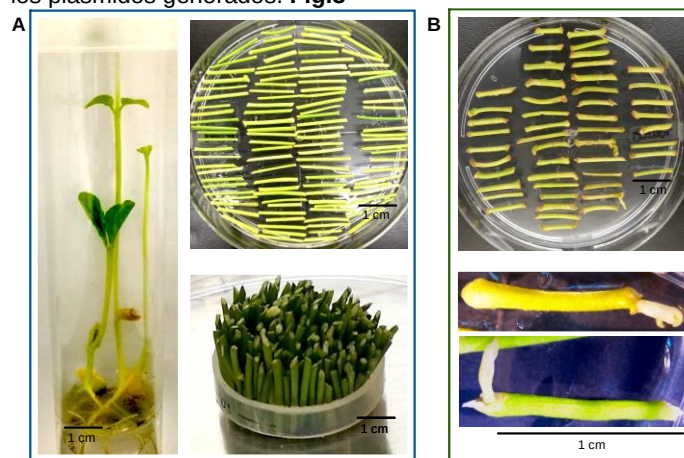


Fig. 3 A) Explantes de *C. aurantifolia* antes de la transformación B) Posterior a la transformación, en proceso de selección y regeneración en medio con glufosinato de amonio

Conclusiones. Se implementó una estrategia de edición del genoma de *C. aurantifolia* introduciendo la fusión de CsPP16 con P322 a un promotor de floema con el fin de aumentar su tolerancia a infecciones bacterianas.

Agradecimientos. Al CONACYT por la beca otorgada. Financiado por el Convenio CINVSTAV-SENASICA 2018 y el Proyecto Fronteras de la Ciencia 1234.

Bibliografía.

- (1) SAGARPA (2017) *Planeación Agrícola Nacional 2016-2030*.
- (2) Bové, J., & de Barros, A. (2006). *J. Plant Pathol*, 88:7-37.
- (3) Gottwald, T. (2010). *Annu Rev Phytopathol*, 48(1):119-139.
- (4) Xoconostle-Cázares, B. *et al.* (1999). *Science*, 283: 94 – 98.
- (5) Wu, H. *et al.* (2016). *Plant Cell*, 35(9), 1955–1962.





Notas:

1. Las palabras: **Introducción, Metodología, Resultados, Conclusiones, Bibliografía y Agradecimientos** van escritas con letra **Arial negrita 10**. El resto del texto de cada sección deberá ir escrito con letra normal Arial tamaño 10, a menos que se indique otro formato.
2. El nombre del trabajo, la lista de autores y el autor responsable, deberán llenarse en línea en: <https://smbb.mx/xviii-congreso-nacional-de-biotecnologia-y-bioingenieria-leon-2019/#info>. En cuanto se abra la recepción de trabajos.
3. Una vez que se tenga el resumen revisado y autorizado por todos los autores, se deberá convertir a PDF que es el único formato aceptado el sistema de evaluación.
4. El archivo deberá tener como máximo 2 MB, si las imágenes insertadas son muy pesadas deberán ser comprimidas en formato JPEG.
5. **El resumen, si es aceptado, será reproducido sin modificaciones, tal como fue enviado, por lo que su contenido es responsabilidad de los autores.**

