

# PROYECTO FID 18-050

## Mejoramiento de la naranja criolla (*Citrus sinensis* L) para resistencia a Huanglongbing (HLB)

---

Reunión del Comité Técnico del Proyecto y  
SENACYT Dirección de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico  
para seguimiento y evaluación  
31 de marzo de 2023.  
Centro de Innovación Agropecuaria Divisa.

Actividad 03

# Identificación de genes de susceptibilidad

---

**Sandra Sopalda Prince**

Dr. Humberto Prieto, Dr. Ricardo Vergara

31 de marzo de 2023

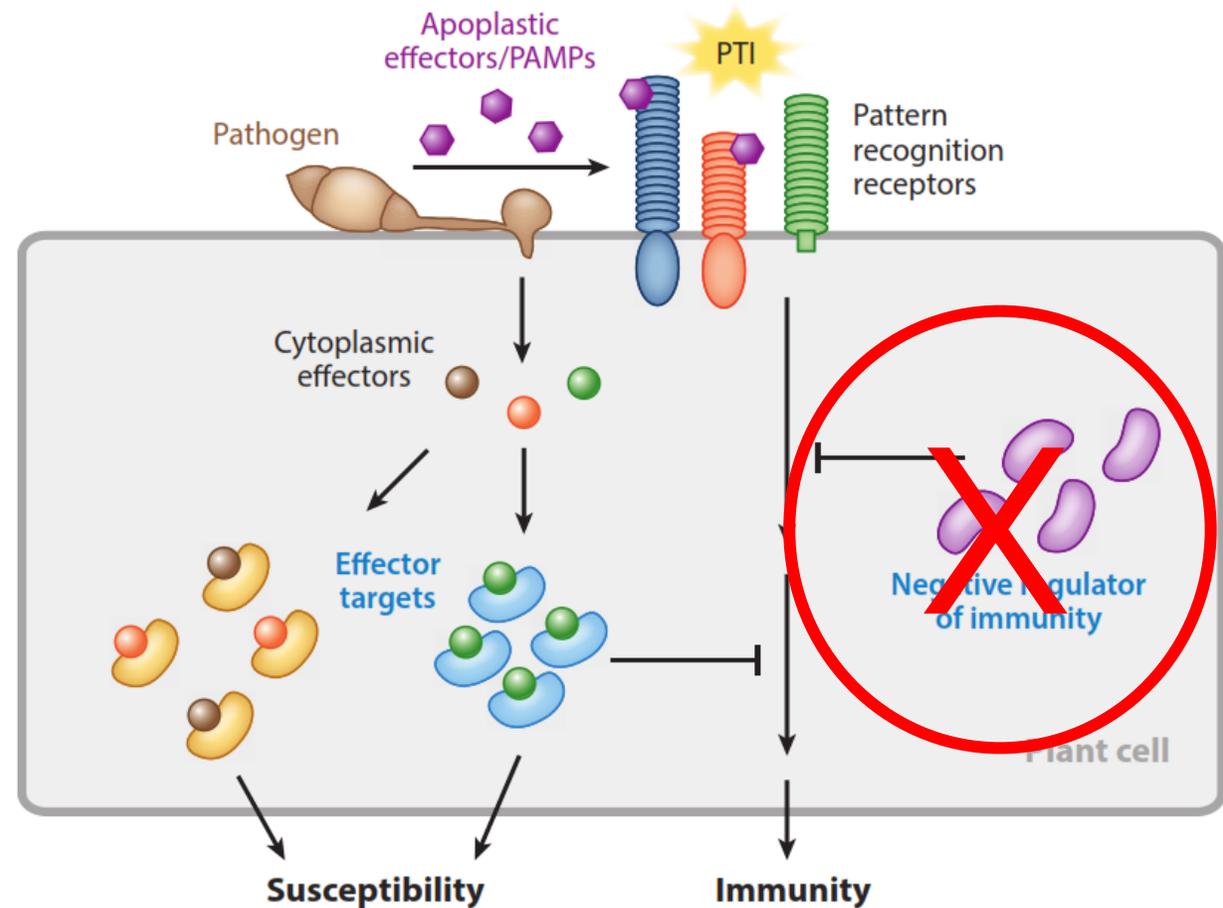
# Genes de susceptibilidad

## Propician la enfermedad

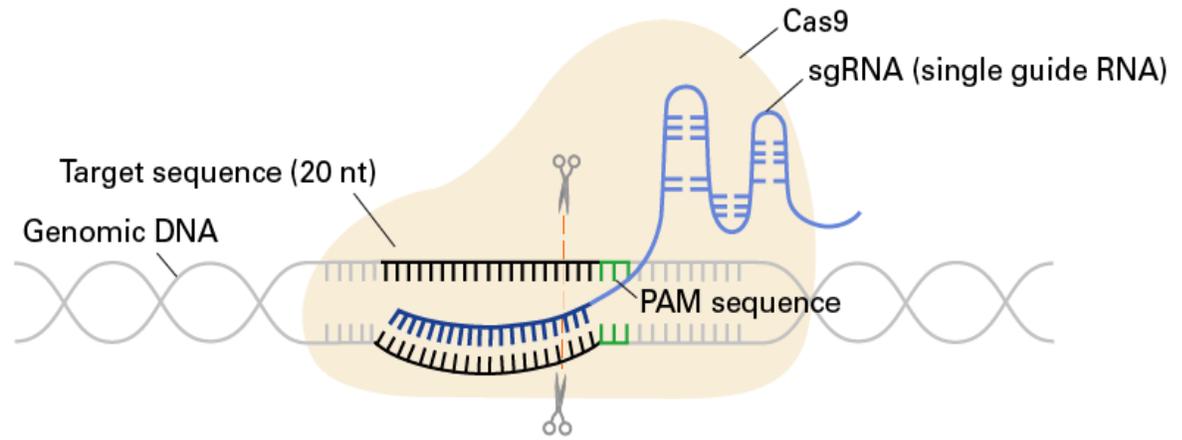
- Facilitadoras del proceso de infección.

## Mutación génica

- Resistencia recesiva



# Sistema CRISPR/Cas



Analizar *in silico* eventuales **genes de susceptibilidad** de *Citrus* spp.

- Identificación de genes

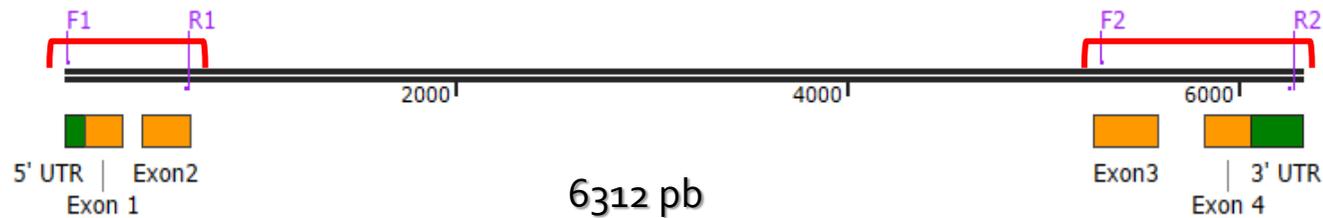
**Desarrollar vectores de edición génica** para expresar parejas de RNA guías.

Evaluar la **capacidad de inactivación por corte de los editores génico** diseñados utilizando el sistema de cultivo *in vitro*.

# Genes de susceptibilidad de *Citrus* spp.

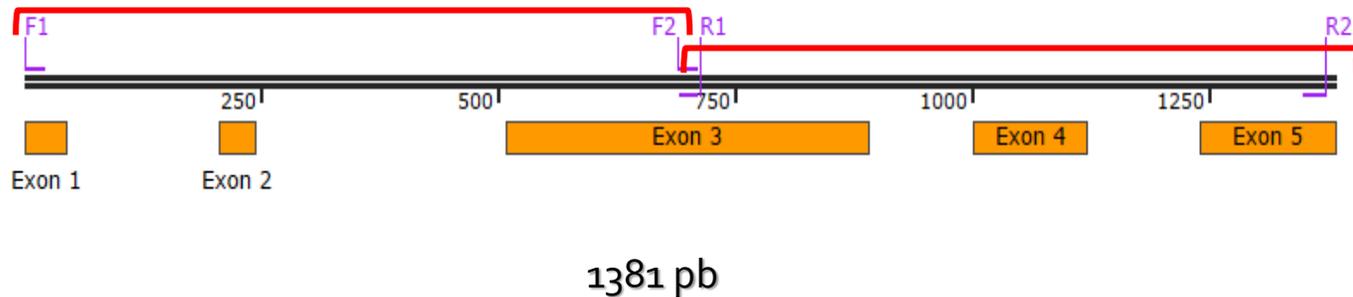
---

# Gen CsDMR6



Primer	Secuencia (5'->3')	Tamaño
CsDMR6 F1	TTCCTAGAAGGTGCAAATACTTTTG	623
CsDMR6 R1	AAGGTAGATGGATTTGAAGGCC	
CsDMR6 F2	TCGGCTATAGAGTGCTGGAATT	981
CsDMR6 R2	TCAGATACATCACTACTCAAAGGTT	

# Gen CsSWEET4



Primer	Secuencia (5'->3')	Tamaño
CsSWEET4 F1	ATGGTTTCAGCTGAGGCTGCTC	712
CsSWEET4 R1	GCGATTGTAGACGCAGAAGATGG	
CsSWEET4 F2	CCATCTTCTGCGTCTACAATCGC	683
CsSWEET4 R2	GGTTGCACCAGAGAGCTGAACTTC	

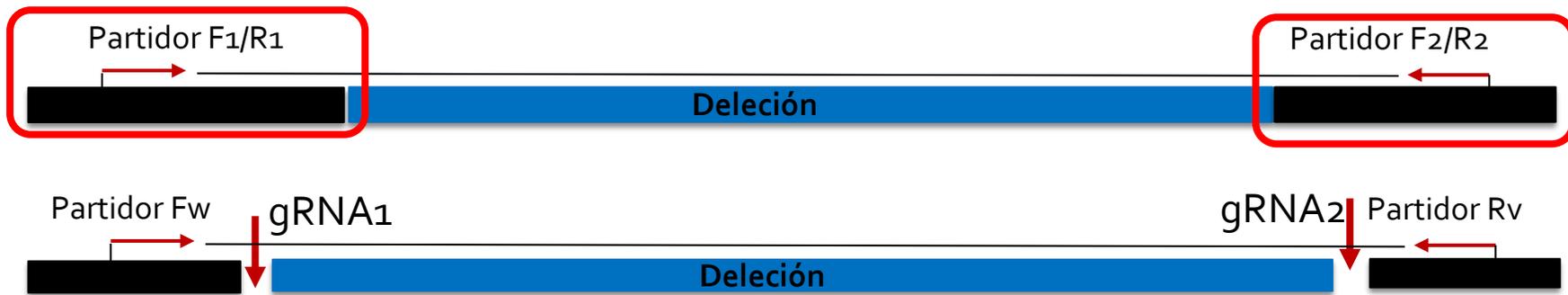
# Desarrollar **vectores de edición génica** para expresar parejas de RNA guías

---

**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	+	GTTTGTGTACCGGATTCCCGAGG	0.845	1.279	5361
unknown1(2)	scaffold00343	79366	79388	+	GCTCTGGCTCTGGACATGGTGGG	0.412	84647	84669	+	GTTTGTGTACCGGATTCCCGAGG	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	+	GTTTGTGTACCGGATTCCCGAGG	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	+	GTTTGTGTACCGGATTCCCGAGG	0.845	1.211	5627
unknown1(7)	scaffold00343	78903	78925	-	TTGTGAATGCTGAAAAGGCAAGG	0.348	84647	84669	+	GTTTGTGTACCGGATTCCCGAGG	0.845	1.193	5722
unknown1(8)	scaffold00343	79356	79378	-	CCAGAGCCAGAGCTTACTTATGG	0.376	84636	84658	-	CGGTACACAAACTTGCCGGAGGG	0.807	1.188	5258
unknown1(9)	scaffold00343	79297	79319	-	TTTATTGCAAGATTTAGAAGTGG	0.332							
unknown1(10)	scaffold00343	78998	79020	-	GGCTTATTATCAATATTCATCGG	0.366							
unknown1(11)	scaffold00343	79455	79477	-	GAATTAATATCAGAGAGCTTAGG	0.324							
unknown1(12)	scaffold00343	79362	79384	+	GTAAGCTCTGGCTCTGGACATGG	0.322							
unknown1(13)	scaffold00343	78903	78925	-	TTGTGAATGCTGAAAAGGCAAGG	0.348							
unknown1(14)	scaffold00343	79297	79319	-	TTTATTGCAAGATTTAGAAGTGG	0.332							
unknown1(15)	scaffold00343	79229	79251	+	AATGACAAAGGCATTAGGAAGGG	0.288							

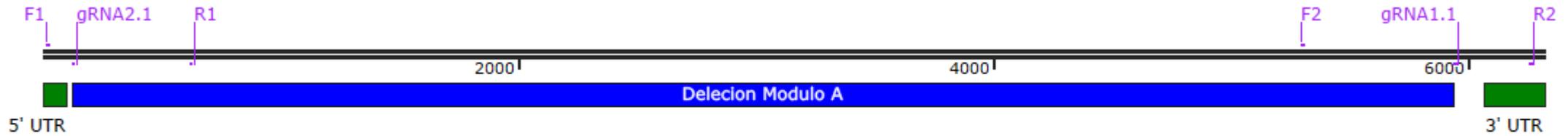
-- Off targets --

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

No off-targets with less than 4 mismatches were found

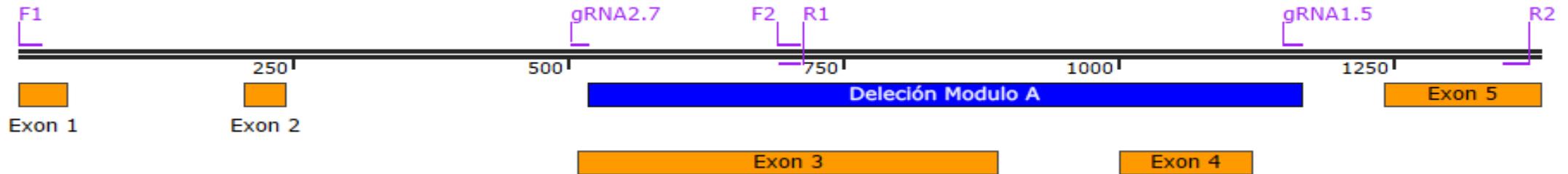
Chr	Sequence	Str	Position	Location
scaffold00252	CGGTACACA <del>T</del> ACTTG <del>G</del> AGGA	-	88351	intergenic
scaffold00739	CGGTACACA <del>T</del> ACTTG <del>G</del> AGGA	-	70119	intergenic
scaffold00761	CGGTACACA <del>T</del> ACTTG <del>G</del> AGGA	-	5093	intergenic
scaffold02714	CGGTACACA <del>T</del> ACTTG <del>G</del> AGGA	-	3113	intergenic
scaffold04589	CGGTACACA <del>T</del> ACTTG <del>G</del> AGGA	+	4426	intergenic

# CsDMR6



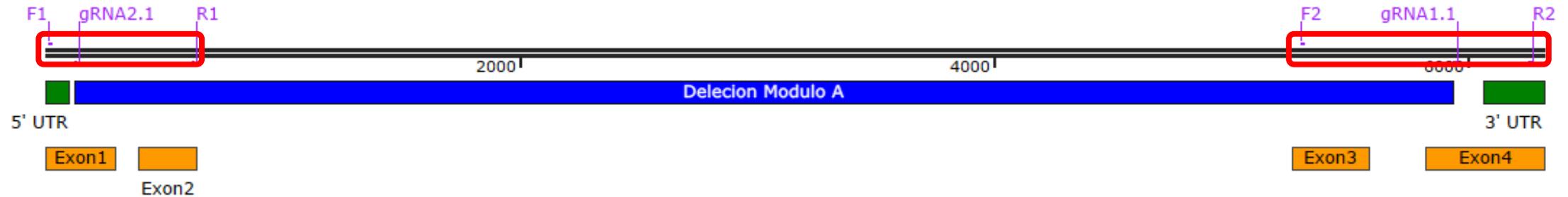
sgRNA	Secuencia	Delección
sgRNA 1.1	CCTCTGTTAATGCTTTTGGG	5814 pb
sgRNA 2.1	GTTTGTGTACCGGATTCCCG	

# CsSWEET4

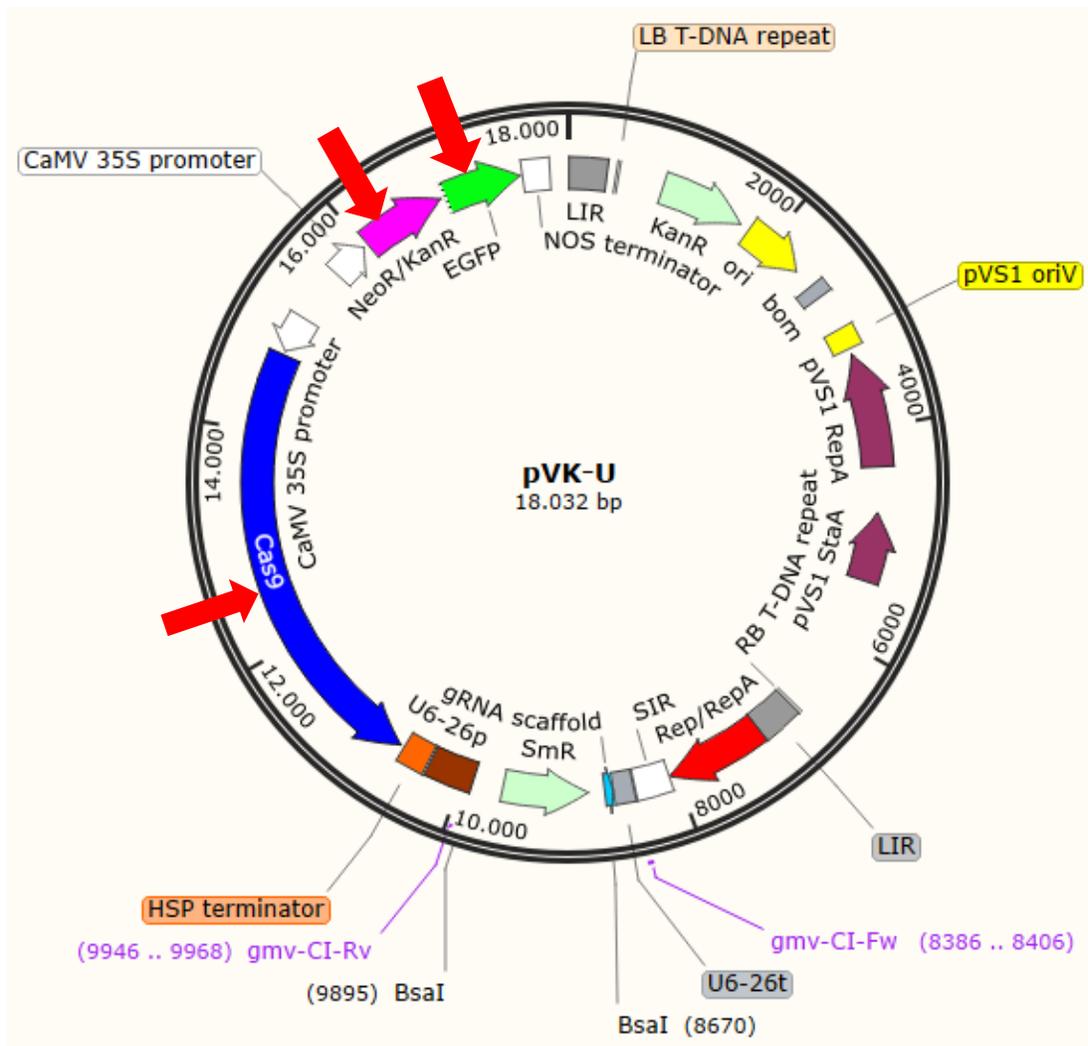


sgRNA	Secuencia	Delección
sgRNA 1.5	TTTTATTAATAAGCAGGCCA	648 pb
sgRNA 2.7	CATGCAGGCCGACGTTTTGG	

# CsDMR6



	120	130	140	5930	5940	5950	5960	
CsDMR6	TTCTGT	<b>CCTCGGGAATCCGGTACACAAA</b>	CTTGCC	//	ATCAG	<b>CCC</b>	<b>TCCAAAAGCATTAAACAGAG</b>	GATGGATC
Cs Valencia	TTCTGT	<b>CCTCGGGAATCCGGTACACAAA</b>	CTTGCC	//	ATCAG	<b>CCC</b>	<b>TCCAAAAGCATTAAACAGAG</b>	GATGGATC
Cs Híbrido1	TTCTGT	<b>CCTCGGGAATCCGGTACACAAA</b>	CTTGCC	//	ATCAG	<b>CCC</b>	<b>TCCAAAAGCATTAAACAGAG</b>	GATGGATC
Cs Híbrido2	TTCTGT	<b>CCGCGGGAATCCGGTACACAAA</b>	CTTGCC	//	ATCAG	<b>CCC</b>	<b>TCCAAAAGCATTAAACAGAG</b>	GATGGATC
Cs Híbrido3	TTCTGT	<b>CCGCGGGAATCCGGTACACAAA</b>	CTTGCC	//	ATCAG	<b>CCC</b>	<b>TCCAAAAGCATTAAACAGAG</b>	GATGGATC
Limón Híbrido	TTCTGT	<b>CCTCGGGAATCCGGTACACAAA</b>	CTTGCC	//	ATCAG	<b>CCC</b>	<b>TCCAAAAGCATTAAACAGAG</b>	GATGGATC
		<b>PAM</b>	<b>gRNA2.1</b>		<b>PAM</b>	<b>gRNA1.1</b>		

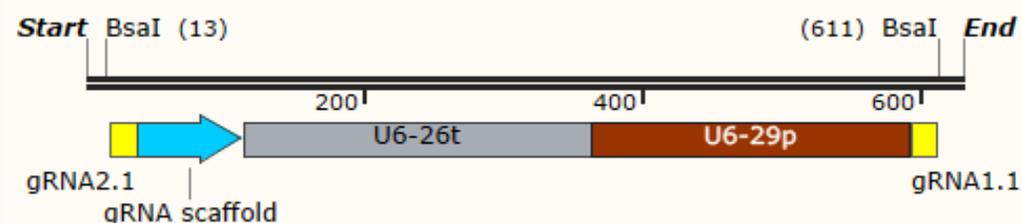


### CsDMR6

sgRNA	Secuencia	Delección
sgRNA 1.1	CCTCTGTTAATGCTTTTGG	5814 pb
sgRNA 2.1	GTTTGTGTACCGGATTCCCG	

### CsSWEET4

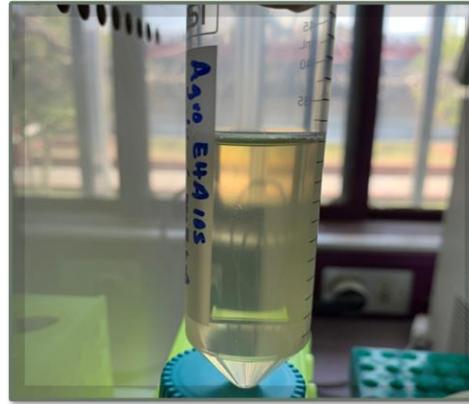
sgRNA	Secuencia	Delección
sgRNA 1.5	TTTTATTAATAAGCAGGCCA	648 pb
sgRNA 2.7	CATGCAGGCCGACGTTTTGG	



**Evaluar la capacidad de inactivación por corte  
de los editores génicos diseñados utilizando el  
sistema de cultivo *in vitro***

---

# Transformación mediada por *Agrobacterium*



*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



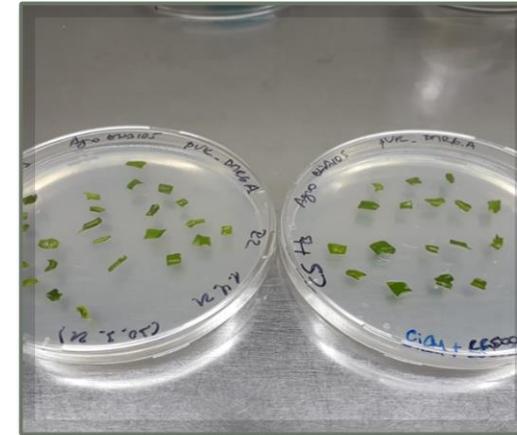
Colocar los explantes en la  
solución con *Agrobacterium*



Dejarlos en medio de  
CoCultivo durante

2d

4d

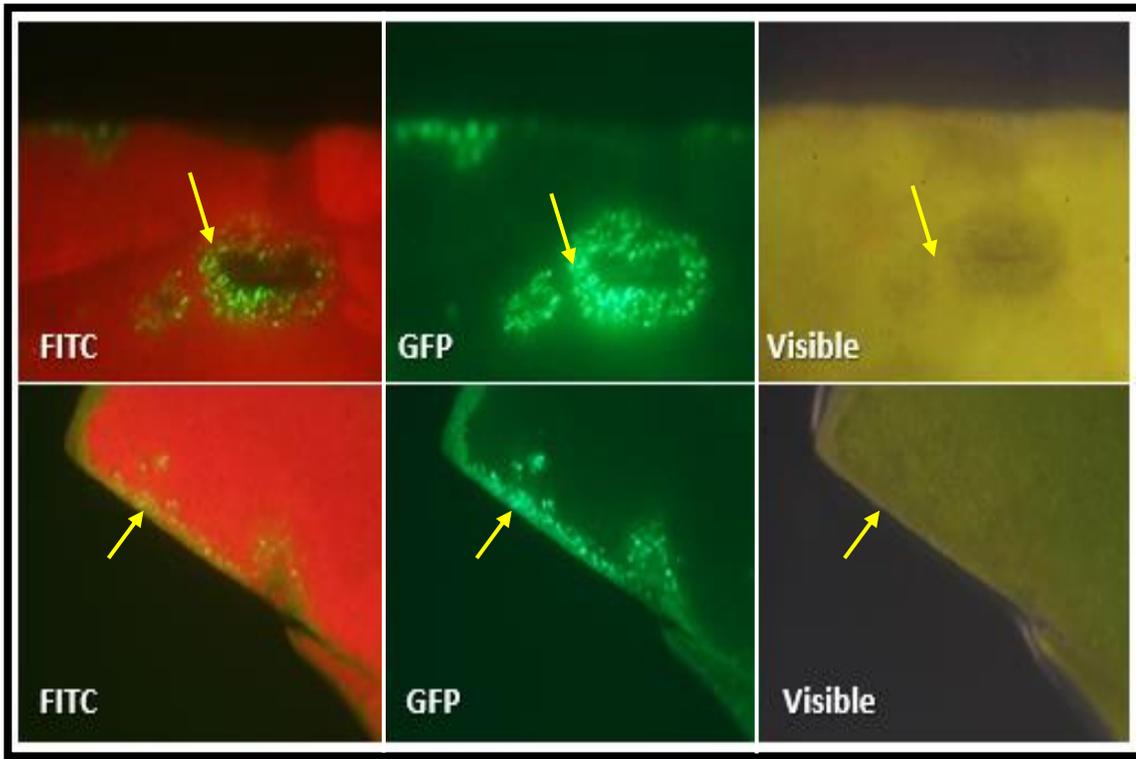


Lavado de los explantes,  
transferir a CiCM

T<sub>1</sub>

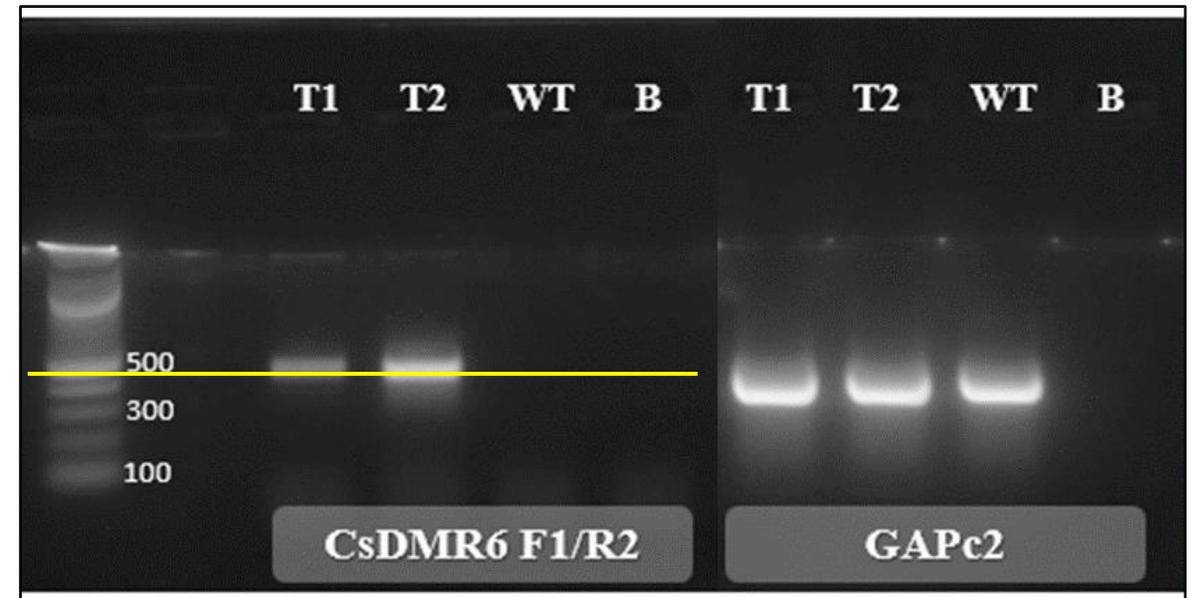
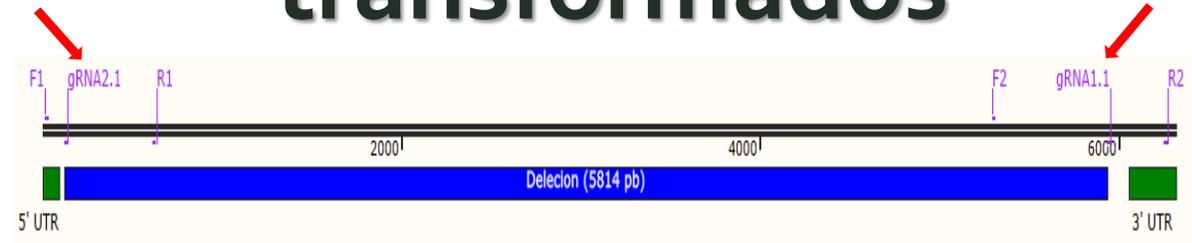
T<sub>2</sub>

# 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

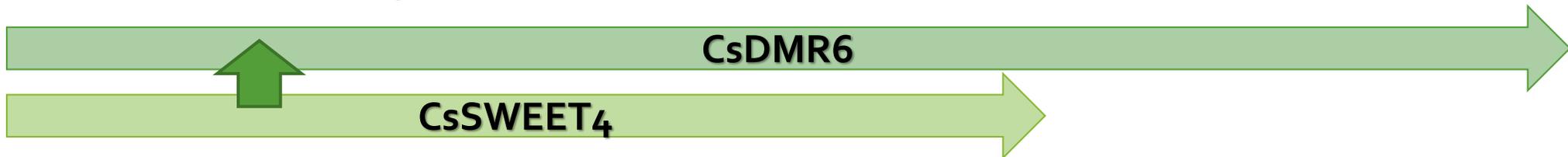
	100	110	120	130	140	5814 pb	5930	5940	5950	5960	nt	
	.....	.....	.....	.....	.....	//	.....	.....	.....	.....		
CsDMR6 genómico	<u>TTATGGATACCAAAGTTCTGTCCTCGGGAATCCGGTACACAAACTTGCC // ATCAGCCCTCCAAAAGCATTACAGAGGATGGATCTGGAG</u>											wt
CsDMR6 editado	TTATGGATACCAAAGTTCTGTCCTCGG~~~~~AAAAGCATTACAGAGGATGGATCTGGAG											0/0

Analizar *in silico* eventuales **genes de susceptibilidad** de *Citrus* spp.

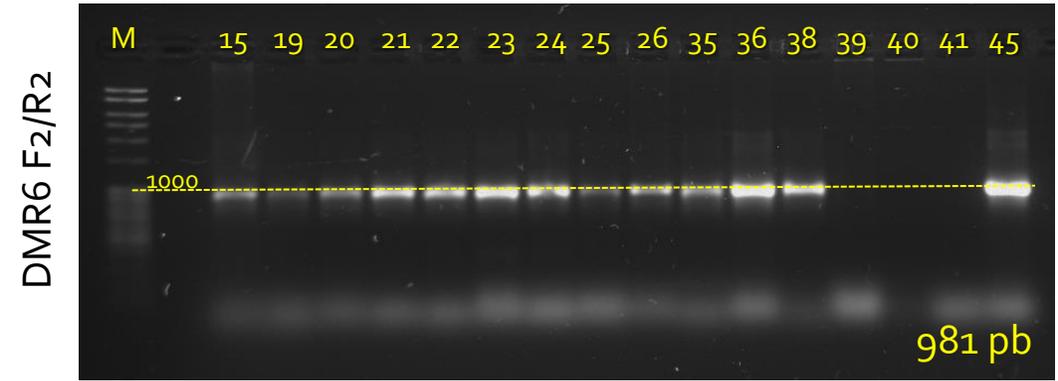
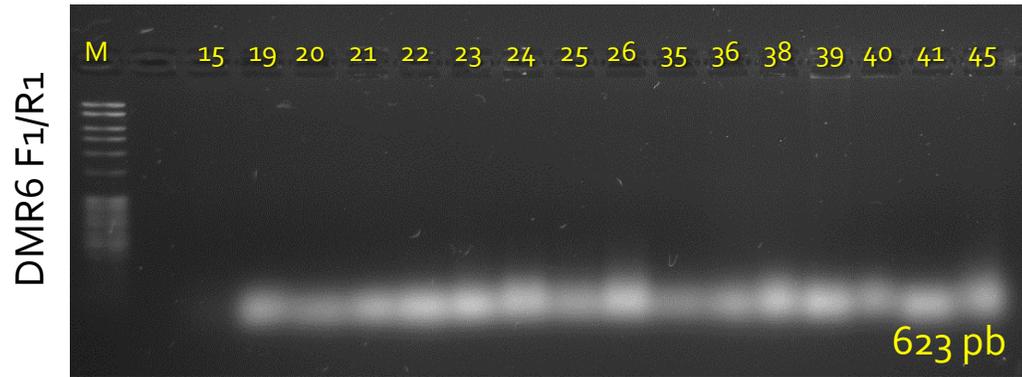
- Identificación de los genes

**Desarrollar vectores de edición génica** para expresar parejas de RNA guías.

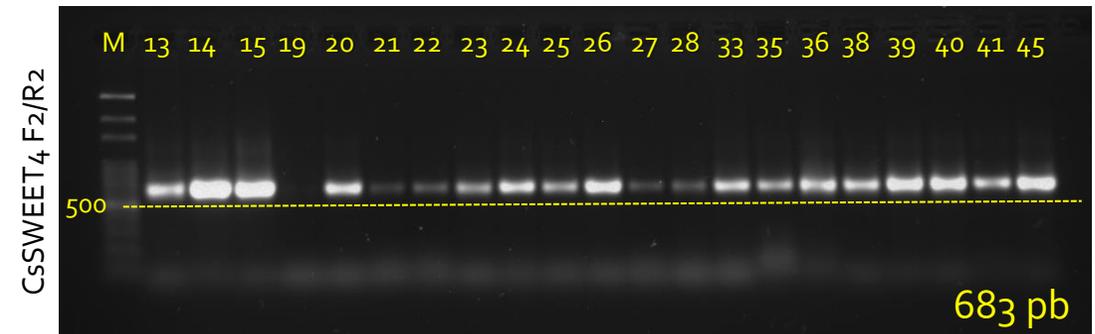
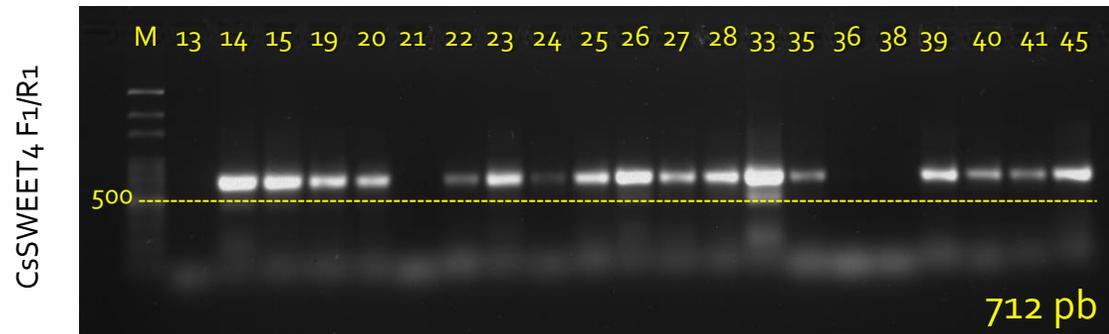
Evaluar la **capacidad de inactivación por corte de los editores génico** diseñados utilizando el sistema de cultivo *in vitro*.



# CsDMR6



# CsSweet4



# Genes de susceptibilidad

Muestra	CsDMR6		CsSWEET4	
	F1/R1	F2/R2	F1/R1	F2/R2
Ci13	0	0	0	1
<b>Ci14</b>	0	1	1	1
Ci15	0	1	1	1
Ci19	0	1	1	0
Ci20	0	1	1	1
Ci21	0	1	0	0
Ci22	0	1	1	1
Ci23	0	1	1	1
Ci24	0	1	1	1
Ci25	0	1	1	1
Ci26	1	1	1	1
Ci27	0	0	1	1
Ci28	0	0	1	1
Ci33	0	0	1	1

Muestra	CsDMR6		CsSWEET4	
	F1/R1	F2/R2	F1/R1	F2/R2
Ci35	0	1	1	1
Ci36	0	1	0	1
Ci38	0	1	0	1
Ci39	0	0	1	1
Ci40	0	0	1	1
Ci41	0	0	1	1
Ci45	0	0	0	1
Ci46	0	0	1	1
Ci47	0	1	1	1
Ci48	0	0	1	1
Ci51	0	0	1	1
Ci52	0	0	1	1
Ci53	0	1	1	1
Ci54	1	1	1	1

Muestra	CsDMR6		CsSWEET4	
	F1/R1	F2/R2	F1/R1	F2/R2
Ci55	0	1	1	1
Ci56	0	1	0	1
Ci76	1	-	-	-
Ci77	1	-	-	-
Ci149	0	0	0	0
Ci150	0	0	0	0
Ci163	0	0	0	0
Ci164	0	0	0	0
Ci165	0	0	0	0
Ci166	0	0	0	0
Ci167	0	0	0	0
Ci172	0	0	0	0
Ci173	0	0	0	0
Ci174	0	0	0	0
Ci175	0	0	0	0

Analizar *in silico* eventuales **genes de susceptibilidad** de *Citrus* spp.

- Identificación de los genes

**Desarrollar vectores de edición génica** para expresar parejas de RNA guías.

Evaluar la **capacidad de inactivación por corte de los editores génicos** diseñados utilizando el sistema de cultivo *in vitro*.