



## EDIÇÃO DO GENE DE SUSCETIBILIDADE EM LARANJA DOCE CSLOB1 UTILIZADO O SISTEMA CRISPR/CAS9 VISANDO RESISTÊNCIA AO CANCRO CÍTRICO

Caroline Viera **Borrejo**<sup>1</sup>; Isis Gabriela Barbosa **Carvalho**<sup>2</sup>; Reinaldo Rodrigues **de Souza-Neto**<sup>3</sup>;  
Alessandra Alves **de Souza**<sup>4</sup>

Nº 22106

**RESUMO** – *Citrus sinensis* LARETAL ORGAN BOUNDARY 1 (CsLOB1), é um fator de transcrição específico da planta que foi previamente descrito como um gene de suscetibilidade ao cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc). O CsLOB1 é um alvo direto do PthA4, um transcription activator-like effector, sendo esse o principal efector de Xcc associado a indução dos sintomas. Dados obtidos pelo nosso grupo demonstraram que um gene que codifica uma expansina é diretamente regulado pelo CsLOB1, após ativado pelo PthA4, sugerindo ser um gene de susceptibilidade indiretamente regulado pelo PthA4. Assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver vetores CRISPR/Cas9 para edição dos genes LOB1 e expansina de *C. sinensis*. Epicótilos da variedade 'Valencia' foram utilizados para transformação genética com *Agrobacterium tumefaciens* contendo as construções pCambia/Cas9\_sgLOB1 e pDirect/Cas9\_sgEXP. Para o vetor pCambia/Cas9\_sgLOB1 obtivemos 572 brotos dos 2144 explantes resultantes de oito transformações e para o vetor pDirect/Cas9\_sgEXP, obtivemos 176 brotos dos 2370 explantes de outras sete transformações. O vetor pCambia/Cas9\_sgLOB1 possui o gene GUS, assim 2 plantas foram positivas para o ensaio histoquímico GUS. O vetor pDirect/Cas9\_sgEXP não possui o gene GUS, então a extração de DNA foi realizada para selecionar os brotos positivos. No total foram obtidos 25 brotos positivos detectados por PCR. Conclui-se que o vetor pDIRECT\_EXP foi mais eficiente para transformação genética que o pCAMBIA, possivelmente por esse vetor possuir mais de um sgRNA alvo de edição gênica na construção. Os brotos positivos foram enxertados para futura avaliação quanto a resistência a Xcc.

**Palavras-chaves:** CRISPR-Cas9, cancro cítrico, gene de suscetibilidade, laranja doce

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, Araras-SP.

2 Colaborador, Bolsista Treinamento Técnico 3 Fapesp: Mestre pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Instituto Agrônomo de Campinas, Cordeirópolis-SP.

3 Colaborador, Bolsista Doutorado Fapesp: Mestre pelo Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

4 Orientador: Pesquisador do Instituto Agrônomo de Campinas, Cordeirópolis-SP.



**ABSTRACT** – *Citrus sinensis* LARETAL ORGAN BOUNDARY 1 (CsLOB1), a plant-specific transcription factor was previously described as a citrus canker susceptibility gene, caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc). CsLOB1 is a direct target of PthA4, a transcription activator-like effector, which is the main Xcc effector associated with symptom induction. Data obtained by our research group showed that a gene encoding for expansin is directly regulated by CsLOB1, after being activated by PthA4, suggesting that it is a susceptibility gene indirectly regulated by PthA4. Thus, the objective of this study was to develop CRISPR/Cas9 vectors for editing expansin and LOB1 genes of *C. sinensis*. Epicotyls from ‘Valencia’ variety were used for genetic transformation with *Agrobacterium tumefaciens* containing the pCambia/Cas9\_sgLOB1 and pDirect/Cas9\_sgEXP constructs. For vector pCambia/Cas9\_sgLOB1 were obtained 572 shoots from 2144 explants, resulting from eight transformations, and for vector pDirect/Cas9\_sgEXP were obtained 176 shoots from 2370 explants, from other seven transformations. The pCambia/Cas9\_sgLOB1 vector has the GUS gene, and only 2 plants were positive for the GUS histochemical assay. The pDirect/Cas9\_sgEXP vector does not have the GUS gene in its construction, thus DNA extraction was performed to select positive shoots. In total, 25 positive shoots were detected by PCR. As conclusion the pDIRECT\_EXP vector was more efficient for genetic transformation than pCAMBIA, possibly because this vector has more than one sgRNA target for gene editing in the construction. Positive shoots were grafted for future evaluation for resistance to Xcc.

**Keywords:** CRISPR-Cas9, citrus canker, susceptibility gene, sweet orange.