



TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE LARANJA DOCE VISANDO A EDIÇÃO DO GENE CALOSE SINTASE 12 (CSCALS12)

Daniela Beatriz da **Silva**¹; Dhiôvanna Corrêia **Rocha**²; Guilherme Souza **Prado**³; Mariana de Souza e **Silva**⁴; Alessandra Alves De **Souza**⁵

Nº 24107

RESUMO - O HLB é a doença que mais impacta a citricultura mundial, causando grandes perdas econômicas. Causada principalmente pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e transmitida pelo inseto vetor *Diaphorina citri*. A colonização bacteriana leva à expressão de genes de sensibilidade nas plantas, resultando na deposição de proteínas no floema e interrompendo o transporte de nutrientes. Estudos mostram que a expressão dos genes *CsCa/S7* e *CsCa/S12* aumenta em plantas suscetíveis ao HLB. Atualmente, não existem variedades de laranja doce resistentes ao HLB, tornando necessária a adoção de novas abordagens para seu controle. Neste estudo, a tecnologia CRISPR/Cas foi utilizada para edição do genoma silenciando o gene *CsCa/S12*. Os experimentos envolveram a transformação de epicótilos de *C. sinensis* cv. Valência e do híbrido citrange Carrizo. As transformações foram conduzidas utilizando o vetor de expressão pCsMAD7U6, que inclui o cassete de expressão da enzima eErCas12a (MAD7), otimizado para códons de plantas e controlado pelo promotor CaMV 35S. O vetor pMAD7:CsCa/S12 foi replicado na cepa de *Escherichia coli* e transferido para *Agrobacterium tumefaciens*, utilizada para transformar os epicótilos. Os brotos transformados foram identificados por PCR e os positivos foram microenxertados. Um total de 3.418 epicótilos foram transformados apresentando uma eficiência de transformação de 7,11% e 5,84% para Valência e Carrizo, respectivamente. Conclui-se que foi gerada e validada a transformação genética usando o sistema CRISPR/Cas12a visando diminuir a produção de calose e diminuir os danos causados pelo HLB.

Palavras-chaves: HLB, Greening, *Candidatus Liberibacter* spp., CRISPR.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biotecnologia, UFSCar, Araras, São Paulo-Brasil; danielasilva@estudante.ufscar.br

2 Colaborador, Bolsista, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo – Brasil;

3 Bolsista, Instituto Agrônomo de Campinas, Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Cordeirópolis, São Paulo – Brasil;

4 Bolsista, Instituto Agrônomo de Campinas, Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Cordeirópolis, São Paulo – Brasil;

5 Pesquisadora, Instituto Agrônomo de Campinas, Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Cordeirópolis, São Paulo – Brasil; desouza@ccsm.br



ABSTRACT – HLB is the most impactful disease in global citrus cultivation, causing significant economic losses. It is primarily caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) and transmitted by the insect vector *Diaphorina citri*. Bacterial colonization induces the expression of susceptibility genes in plants, resulting in protein deposition in the phloem and disrupting nutrient transport. Studies show that the expression of genes CsCalS7 and CsCalS12 increases in plants susceptible to HLB. Currently, no sweet orange varieties are resistant to HLB, making the adoption of new control approaches necessary. This study used CRISPR/Cas technology to edit the genome by silencing the CsCalS12 gene. The experiments involved transforming epicotyls of *C. sinensis* cv. Valencia and the Carrizo citrange hybrid using the pCsMAD7U6 expression vector, which includes the eErCas12a (MAD7) enzyme expression cassette, optimized for plant codons and controlled by the CaMV 35S promoter. The pMAD7 vector was replicated in *Escherichia coli* and transferred to *Agrobacterium tumefaciens* for epicotyl transformation. Transformed shoots were identified by PCR, and the positives ones were micrografted. A total of 3,418 epicotyls were transformed, with transformation efficiencies of 7.11% for Valencia and 5.84% for Carrizo. The study concludes that genetic transformation using the CRISPR/Cas12a system was generated and validated, aiming to reduce callose production and decrease the damage caused by HLB.

Keywords: HLB, Greening, *Candidatus Liberibacter* spp., CRISPR.