



# Edición genómica en *Citrus L.* para la resistencia a citrus tristeza virus

## Genomic editing in *Citrus L.* for resistance to citrus tristeza virus

Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz\* , Dalain Morciego Estévez ,  
Sandra Pérez Pelaez , Alán Rivero Aragón 

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, carretera a Camajuaní km 5,5, Santa Clara 54830, Cuba

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Recibido: 17/02/2025  
Aceptado: 13/03/2025

### CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no existir conflicto de intereses

### CORRESPONDENCIA

Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz  
[kairuzhd@uclv.edu.cu](mailto:kairuzhd@uclv.edu.cu)  
[kairuzhd@gmail.com](mailto:kairuzhd@gmail.com)



CF: cag011252449

### RESUMEN

**Contexto:** La enfermedad de la tristeza de los cítricos es una amenaza para la producción de cítricos a nivel mundial. La búsqueda de estrategias efectivas para desarrollar plantas resistentes al agente causal de esta enfermedad es una prioridad en la investigación agrícola. **Objetivo:** Proponer una estrategia para la obtención de plantas resistentes a citrus tristeza virus, mediante la edición genómica de especies de *Citrus L.* **Métodos:** Se identificaron los genes candidatos mediante la realización de una revisión sistemática y se diseñaron las secuencias de ARN guías y los constructos génicos para la edición genómica empleando el sistema CRISPR/Cas. **Resultados:** Se seleccionaron los genes virales *p20*, *p23* y *p25* como candidatos para la edición genómica de especies de *Citrus*. Se diseñaron tres secuencias de ARN en horquilla con un espaciador intrónico para su silenciamiento y los ARN guías para la inserción de estas secuencias empleando el sistema CRISPR/Cas9. Finalmente, se propone como estrategia la inserción de constructos precursores de la ribointerferencia para silenciar los efectores virales fundamentales en la evasión de la respuesta defensiva de la planta en el gen de *actina*. **Conclusiones:** La edición genómica se propone como una estrategia eficaz para enfrentar la enfermedad de la tristeza de los cítricos. Luego de una revisión sistemática de la literatura, los genes virales *p20*, *p23* y *p25* fueron identificados como blanco para silenciar efectores virales esenciales en la evasión de las defensas de la planta. Además, se diseñaron constructos de ribointerferencia para su inserción en el gen de *actina* vía CRISPR/Cas9.

**Palabras clave:** eARN guía, citrus tristeza virus, CRISPR/Cas, ribointerferencia

**ABSTRACT**

**Context:** There Citrus tristeza disease is a threat to citrus production worldwide. The search for effective strategies to develop plants resistant to the causal agent of this disease is a priority in agricultural research. **Objective:** To propose a strategy to obtain plants resistant to citrus tristeza virus by genome editing in *Citrus L.* species. **Methods:** Candidate genes were identified through a systematic review, and guide RNA sequences and gene constructs were designed for genome editing using the CRISPR/Cas system. **Results:** The viral genes *p20*, *p23* and *p25* were selected as candidates for genome editing in *Citrus* species. Three hairpin RNA sequences with an intronic spacer for silencing and guide RNAs for insertion of these sequences were designed using the CRISPR/Cas9 system. Finally, insertion of ribointerference precursor constructs into the actin gene is proposed as a strategy to silence viral effectors critical for evading the plant defense response. **Conclusions:** Genome editing is proposed as an effective strategy to control citrus tristeza disease. Following a systematic literature review, the viral genes *p20*, *p23* and *p25* were identified as targets for silencing viral effectors essential for evading plant defense. In addition, ribointerference constructs were designed for insertion into the actin gene using CRISPR/Cas9.

**Keywords:** guide RNA, citrus tristeza virus, CRISPR/Cas, ribointerference

**INTRODUCCIÓN**

Actualmente, los cítricos son de los cultivos frutales más importantes del mundo (Iftikhar *et al.*, 2024). Los principales productores mundiales son Brasil, Estados Unidos de América, China, India, España y México (Caserta *et al.*, 2020; Abutineh *et al.*, 2021). Según Luis-Pantoja y Paredes-Tomás (2020), el programa de cítricos en Cuba se inició en 1967 con el objetivo de abastecer el mercado nacional y el de Europa del Este. En 1990 el área plantada era de unas 144 000 ha y se produjo poco más de un millón de toneladas de fruta. Sin embargo, en el año 2017 se tuvo una producción de 60 205,9 t en un área de 14 000 ha, lo que muestra un drástico descenso de 16 veces con respecto a la cosecha de 1990, debido a factores medioambientales y económicos (Luis-Pantoja y Paredes-Tomás, 2020).

Los cítricos son muy susceptibles a los daños provocados por diferentes insectos, hongos, bacterias y virus (Caserta *et al.*, 2020; Iftikhar *et al.*, 2024). Particularmente, la enfermedad de la tristeza de los cítricos produce daños económicos importantes a la industria de los cítricos. Esta es provocada por citrus tristeza virus (CTV), un closterovirus transmitido por *Aphis citricidus* (Kirkaldy, 1907). Los síntomas de la tristeza de los cítricos incluyen decaimiento rápido, clorosis foliar, daños en meristemos y frutos pequeños (Abutineh *et al.*, 2021). En 1992 fue detectada la presencia de CTV en Cuba.

Para la inducción de resistencia a CTV se han empleado múltiples métodos como la introducción de genes que codifican proteínas que limitan el reconocimiento viral y su movilidad (Sun *et al.*, 2020). En estos estudios, se han desarrollado modificaciones genéticas exitosas con el objetivo de producir un silenciamiento postranscripcional de los genes virales, particularmente sobre los supresores de silenciamiento de ARN (Li *et al.*, 2019). Adicionalmente, varios autores han recomendado el empleo del sistema CRISPR/Cas9 (del inglés Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9) como una técnica prometedora para la edición genómica de especies de *Citrus* (Henrique *et al.*, 2019; Caserta *et al.*, 2020; Conti *et al.*, 2021). La edición mediante CRISPR/Cas9 ha permitido modificar especies de cítricos eficazmente y en corto tiempo, teniendo en cuenta diversos factor limitantes en este tipo de cultivo (Conti *et al.*, 2019). Aunque se ha informado la obtención de líneas de plantas relativamente tolerantes a CTV, aún no se ha logrado la implementación comercial, pues la elección de genes blanco, el proceso de selección y el desarrollo vegetativo son complicados y lentos para los cítricos (Henrique *et al.*, 2019; Caserta *et al.*, 2020). En este trabajo tiene como objetivo proponer una estrategia para la obtención de plantas resistentes a CTV, mediante la edición genómica de especies de *Citrus L.*

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Identificación de los genes candidatos para la edición genómica de especies de *Citrus*

Para la identificación de los genes de interés en la obtención de plantas resistentes a CTV se realizó una revisión sistemática en Google Académico (<https://scholar.google.com>). La búsqueda se acotó temporalmente a los últimos 15 años.

Se emplearon los siguientes términos de búsqueda: *Citrus* AND (citrus tristeza virus OR CTV) AND gene expression OR gen\* editing OR gen\* engineering)

Se analizaron 61 publicaciones distribuidas en las categorías de revisión bibliográfica (25), ingeniería genética (15), y otros temas (21). Como resultado se elaboró una base de datos que toma como la variable principal al gen de interés (o gen promisorio para la modificación genética). Se incluyeron además las siguientes variables:

- Especie estudiada
- Fuente (referencia bibliográfica)
- Efecto (referido a la influencia del gen sobre la respuesta de la planta ante la enfermedad)
- Objetivo del estudio
- Observaciones (opcional)

### Diseño de las secuencias de ARN guía y los constructos genéticos para la edición genómica

Para el diseño de los ARN guías (ARNg), en primer lugar, se obtuvieron las secuencias de los genes candidatos para la transformación, de acuerdo con los resultados del acápite anterior. Además, se identificó una región de 20 nucleótidos complementaria a la secuencia del ARN guía simple (ARNsg) para que el sistema CRISPR/Cas pueda actuar sobre el genoma. En dependencia de la proteína Cas seleccionada, debe existir una secuencia PAM específica en la región objetivo del genoma.

El diseño de los ARNsg se realizó mediante la herramienta CRISPR-P (BioInfo, 2016; CRISPR-P v2.0, <http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>) sobre el genoma de *Citrus sinensis* v. 2.0. Las secuencias e identificadores de los genes seleccionados fueron recuperadas de Nucleotide (National Library of Medicine (US), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) y estas fueron utilizadas como entrada para CRISPR-P. La nucleasa Cas elegida fue Cas9 de *Streptococcus* <http://cagricola.uclv.edu.cu>

*pyogenes* (*SpCas9*), cuyo PAM es 5'-NGG-3'. Como secuencia de andamiaje (*scaffold*) para la unión se empleó la predeterminada para *SpCas9*:

```
GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU
AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU
GGCACCGAGUCGGUGCUUUU
```

La longitud del ARNg se fijó en 20 nucleótidos.

Solo se escogieron ARNg complementarios a los exones del gen seleccionado, y si su contenido de GC estaba en el intervalo de 30-80%. Como método de selección avanzada se analizó la estructura secundaria de los ARNsg, sobre los principios:

- No más de 12 pares de bases en el ARNsg
- No más de siete bases iguales consecutivas
- No más de seis pares de bases en la secuencia guía

De los ARNsg obtenidos se eligieron preferentemente los complementarios a la cadena directa del gen. Cuando no se encontró un ARNsg que cumpliera todos los requisitos, se eligieron los ARNsg complementarios a la cadena inversa y que cumplieran los restantes requisitos.

Los genes con posibles reconocimientos fuera del blanco (*off-target*) fueron identificados en Citrus Genome Database (MainLab Bioinformatics, 2022; Citrus Genome Database, [citrusgenomedb.org](http://citrusgenomedb.org)) y analizados con BLAST (National Center for Biotechnology Information; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para evaluar su importancia en el genoma. Los ARNsg con posibles reconocimientos fuera del blanco en genes importantes fueron descartados, a menos que la eficiencia de edición en ese punto fuera muy baja.

### Diseño de secuencias para el silenciamiento de los genes virales

Las secuencias nucleotídicas de los genes virales elegidos para el silenciamiento fueron recuperadas de Nucleotide (National Library of Medicine (US), 1988). Se escogieron las 400 primeras bases 5' en orientación sentido, y a continuación se colocó su complemento inverso para producir un ARN en horquilla con espaciador intrónico (ARNihp). Como espaciador se empleó un intrón completo del gen *Cs6g06250.3* de *C. sinensis* codificante para la actina según las recomendaciones de Stoutjesdijk *et al.* (2015).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN****Identificación de los genes candidatos para inducir resistencia a CTV**

Para el desarrollo de líneas resistentes a CTV, mediante la edición genómica de especies de interés comercial, es necesario identificar los genes candidatos. Con este fin, se encontraron 61 publicaciones de los últimos 15 años utilizando los términos de búsqueda descritos anteriormente. De modo general, las publicaciones encontradas pueden clasificarse en tres grupos: revisiones bibliográficas, artículos científicos enfocados en la ingeniería genética, y otras investigaciones de interés.

Las revisiones bibliográficas trataron los temas de la ingeniería genética para obtener cítricos resistentes, los mecanismos de protección cruzada y superinfección y el empleo de CTV como vector de transformación.

Las investigaciones de ingeniería genética se centran en el silenciamiento de genes virales (Li *et al.*, 2019) y el empleo de anticuerpos neutralizantes contra el virus (Cervera *et al.*, 2010). El resto de las publicaciones abordaron temas diversos, como la caracterización regional de aislados del virus, comparaciones moleculares entre aislados transmisibles y no trans-

misibles por áfidos, estudios filogenéticos y métodos de detección.

En los experimentos de transformación, los explantes iniciales fueron segmentos internodales (Cervera *et al.*, 2010) o segmentos de epicótilo (Çevîk *et al.*, 2012). Por su parte, el método de entrega empleado siempre fue la transfección vía *Agrobacterium tumefaciens*. En ninguno de los artículos revisados se revelaron las eficiencias de regeneración y transformación.

De estas publicaciones se identificaron los genes promisorios para la edición genómica. En la tabla 1 se compilan los genes o constructos génicos identificados en la revisión sistemática y se agrupan de acuerdo con la ontología de genes propuesta en las publicaciones.

En la bibliografía revisada se encontró un consenso acerca de los genes de interés para obtener tolerancia o resistencia a CTV. En este trabajo, se identificaron 12 genes sugeridos como de interés. Destacan, por su número, genes de las ontologías: proteínas virales y resistencia a enfermedades, con cinco y cuatro entradas, respectivamente.

CTV es el virus de ARN monocatenario más grande encontrado en las plantas; su genoma tiene aproximadamente 20 kb e incluye 12 ORFs (del inglés *open*

**Tabla 1.** Genes o constructos génicos identificados en la revisión sistemática agrupados de acuerdo con la ontología de genes

Ontología de genes	Genes	Fuente (DOI)
Proteínas virales	<i>CP; p23</i>	10.1007/s00299-007-0445-1
	<i>p25</i>	10.1023/A:1020347415333
	<i>p33</i>	10.1128/JVI.00310-12
	<i>CTV-Rdrp</i>	10.3906/tar-1008-1192
Resistencia a enfermedades	Genes <i>R</i> del locus <i>Ctv</i>	10.5772/1346
		10.9787/PBB.2018.6.3.245
	<i>CsNDR-1; AZI-1; PR-1</i>	10.1186/s12870-020-02399-z 10.18781/R.MEX.FIT.1906-6
Anticuerpos	<i>scFv</i>	10.1007/s11248-010-9378-5
Transporte celular	<i>CaFKBP17-2</i>	10.3390/cells10040934
Defensa contra virus	CRISPR/Cas	10.1186/s13059-015-0799-6
		10.1038/nplants.2015.145
<b>Total:</b>	<b>5</b>	<b>12</b>

*reading frames*). En general, este virus codifica tres supresores del silenciamiento de ARN diferentes: p20, p23 y p25 (Ambrós *et al.*, 2021). Estos autores refieren que p20 es un inhibidor del silenciamiento de ARN intercelular e intracelular y es responsable de la formación de los cuerpos de inclusión durante la infección. Por su parte p23 inhibe la ribointerferencia intracelular, modula la síntesis de ARN viral y actúa como determinante en la patogénesis. Se conoce además que p23 interviene en la translocación intracelular de la proteína de la nucleocápside viral (CP) y el establecimiento de la clorosis (Yang *et al.*, 2021). Mientras que, p25 es la proteína CP de CTV y también funciona como un supresor del silenciamiento sistémico débil (Ambrós *et al.*, 2021). De estos tres supresores de la ribointerferencia, p23 tiene la mayor expresión y la mayor intensidad de la supresión (Li *et al.*, 2019).

La introducción de constructos para el silenciamiento basados en la proteína CP de CTV en cítricos redujo los niveles de replicación viral (Febres *et al.*, 2008). Anteriormente, Domínguez *et al.* (2002) habían desarrollado resistencia y en otros casos ciertos niveles de tolerancia a CTV, mediante la inserción del gen *CP* en plantas de la especie *Citrus aurantiifolia*. De la misma manera, la introducción de constructos basados en la proteína p23 logró prevenir totalmente la replicación viral in planta (Febres *et al.*, 2008). Por su parte, Khalid *et al.* (2017) señalan que el silenciamiento de solo un gen supresor de la ribointerferencia puede no ser efectivo, mientras que el silenciamiento múltiple sí. Teniendo en cuenta todos estos elementos y la función de los genes revisados, se recomienda la selección de los genes virales p20, p23 y p25 para ser silenciados.

#### Diseño de las secuencias de ARN guía y los constructos génicos para la edición genómica

En los últimos años, se han informado numerosos estudios de edición genómica en plantas mediante

CRISPR/Cas. Sin embargo, la mayoría de estos están enfocados en inducir cortes de doble cadena que generan mutaciones precisas en determinados genes. Sin embargo, esta técnica permite también la inserción de un ADN donador externo (*knock-in*), que posibilita la sustitución de alelos o la introducción de transgenes en un sitio blanco (Collonnier *et al.*, 2017). Aún se han publicado pocos trabajos sobre la inserción de genes en plantas y ninguno de ellos en cítricos. No obstante, muchas de las aplicaciones potenciales del sistema CRISPR/Cas incluyen la introducción de genes, y es este el enfoque que se propone en este trabajo para inducir el silenciamiento de las proteínas virales de CTV.

De acuerdo con Collonnier *et al.* (2017), las inserciones guiadas por CRISPR/Cas pueden realizarse en genes reguladores de expresión endógena (conocidos como *housekeeping genes*). Estos genes están involucrados en importantes procesos fisiológicos, por lo que su expresión es regulada con precisión y asegurada mediante múltiples copias en el genoma. De esta manera, dada la baja eficiencia de la inserción, es posible introducir el ADN donador en un segmento codificante del gen, sin que se afecte su función y que se exprese el gen insertado de forma estable y constitutiva (Collonnier *et al.*, 2017).

En este trabajo se ha escogido un gen codificante para actina, de expresión estable y constitutiva y se han diseñado dos ARNg con el fin de insertar secuencias génicas por reparación mediada por homología (Tabla 2). La edición de un mismo locus con dos ARNg aumenta la probabilidad de inducir deleciones, lo que podría estimular el reemplazo del objetivo por la plantilla de ADN donante (Collonnier *et al.*, 2017).

En la tabla 3 se muestran las secuencias completas de los ARNg diseñados (ARNg + andamiaje).

**Tabla 2.** Secuencias de ARNg diseñadas para dirigir la introducción de constructos génicos en el gen *Cs6g06250.3* codificante para actina

Secuencia de ARNg
GACTCCATACCGATCATTGATGG
TCAAGACGCAAGATTGCATGTGG
NNN: secuencia PAM

**Tabla 3.** Secuencias de los ARNsg diseñados para la edición genómica de *Citrus sinensis* con el sistema CRISPR/Cas

ARNsg	Gen objetivo	Exón	Sentido/Antisentido
AGACTAATCCCGTTCGCACCGGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT	<i>Cs9g10770.1</i>	2	Sentido
CGATGCTTGCATATCATCAACGGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT	<i>Cs9g10770.1</i>	1	Antisentido
AAGTAGACACCAAAATCCACGGGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT	<i>Cs9g10770.1</i>	6	Sentido
CTCAGCAGCCAGTTCCGCGAGGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT	<i>Cs6g14080.1</i>	1	Antisentido
GTCATCTCCCACAGCGTCGCGGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT	<i>Cs6g14080.1</i>	1	Sentido
TTTACGGCAACCGACTCAGAGGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT	<i>Cs6g14080.1</i>	3	Sentido
CTCCCAAGCGACATTAGACTCGGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT	<i>Cs6g14080.1</i>	2	Antisentido
CTCCCTCGCAGACAATACATAGGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT	<i>Cs6g14080.1</i>	3	Antisentido
TGTAACCCCATCTCATAGACGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT	<i>Cs6g14080.1</i>	3	Sentido
CATTAGACTCGGCCGCTGACCGGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT	<i>Cs6g14080.1</i>	3	Antisentido
GACTCCATACCGATCATTGATGGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT	<i>Cs6g06250.3</i>		Sentido
TCAAGACGCAAGATTGCATGTGGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT	<i>Cs6g06250.3</i>		Sentido

**Diseño de secuencias para el silenciamiento de los genes virales**

De acuerdo con las recomendaciones realizadas en publicaciones anteriores, se procedió a diseñar tres secuencias de ARN en horquilla con un espaciador intrónico (ARNihp), para el silenciamiento de los genes virales *p20*, *p23* y *p25*. Para el silenciamiento del gen *p20* de CTV (NC\_001661.1:17764-18312) se diseñó el siguiente ARNihp:

ATGCGAGCTTACTTTAGTGTTAATGATTACATAAGCCTTTT-  
GGCTAAGGTCAGCGCTGTTGTGGAACGTTTATGCGATCCCA-  
GCGTAACTCTTGCAGGAAAGTGATGGACGAAAATTAATGACTT-  
TAACTCGTTTCTCGCTTTAGTGACTCTATGAAGTCAGACAT-  
GAACGGAGACCATCAGGATGGCCACCACGAGATGGGTGAA-  
CACAAGTCTCGGTTGTTATGCAACATAGAGGCGAAAATTGCGA-  
GTACTTCTCGACATCATAAGACGTCGGTTCCTCGCGACAA-  
GCTGCTCTGACTAGCGGACAGATGTCATGGGCTTCTTTG-  
TAATGAGGTACATGAGTTCTAGCCACACCAGCTTCGAATCCG-  
TAATGAGGACGGAGTTGAGGTTGGTGGTTAGTATGTTTTTC-  
TTTTTTTTTAAATGCTTGAGATTAATTGGTGATTTTCATT-  
ATTTCTTTCAAGAAAGTTCCTCATGGGAGGACTACTCC-  
TTTCATTTTGAGTGCAGATAACCACCAACCTCAACTCC-

GTCTCATTACGGATTCTGAAGCTGGTGTGGCTAGAACT-  
CATGTACCTCATTACAAAAGAAGCCCATGACATCTGTGCG-  
GCTAGTACAGAGCAGCTTGTGCGGAGTGAACCGACGTC-  
TTATGATGTCGAGAAGTACTCGCAATTCGCCTCTATG-  
TTGCATAACAACCGAGACTTGTGTTACCCATCTCGTG-  
GTGGCCATCTGATGGTCTCCGTTTATGTCTGACTTCA-  
TAGAGTGCCTAAAGCGAGAAACGAGTTAAAGTCATTA-  
ATTTTCGTCCATCACTTCCGCAAGAGTTACGCTGGGATC-  
GCATAAACGTTCCACAACAGCGCTGACCTTAGCCAAAA-  
GGCTTATGTAATCATTAACTAAAGTAAAGCTCGCAT

NNN: secuencia sentido NNN: secuencia antisentido  
NNN: espaciador

Para el silenciamiento del gen *p23* de CTV (NC\_001661.1:18394-19023) se diseñó el siguiente ARNi<sub>hp</sub>:

ATGGATAACTAGCGGACAACTTTCGTTTCTGTGAACC-  
TTTCTGACGAAAGCAACACAGCGACCTGACGTCGAACC-  
CGTGAGTTCGGAAGCGGATCGCTTGGATTTTTACAGAAA-  
ATGAATCCATTATTATCGATGCTTTGATACGGAAAGATAGT-  
TATCAGGGCGCTCGCTTTCGCGCGAGAATAATAGGAGTGTG-  
CGTGGATTGCGGTAGAAAACACGATAAGGGGTTGAAGACT-  
GAACGTAAGTGAAGGTCAACAATACGCAGTCTCAGAACGA-  
GGTGGCGCATATGTTAATGCACGACCCCGTTAAGTATTTAAA-  
CAAAAGAAAAGCTAGAGCCTTTTCTAATGCGGAGATATTT-  
GCGATTGATTTGGTTATGTACACCAAGGAAAGGCGTATGT-  
TTTTCTTTCTTTTTAAATGCTTGAGATTAATTTGGTGA-  
TTTCATTATTTCTTTCAAGAAAGTTCCTCATGGGAG-  
GACTACTCCTTTTCATTTTGAGTGCAGAGCCTTTCCTT-  
GGTGACATAACCAATCAATCGCAAATATCTCCGCAT-  
TAGAAAAGGCTCTAGCTTTTCTTTTGTAAATACTTAA-  
CGGGTCTGCTCATTAAACATATGCCACCTCGTCT-  
GAGACTGCGTATTGTTGACCTTACACTTACGTTACGTC-  
TTCAACCCCTTATCGTGTCTTCTACCGCAATCCACGCA-  
CACTCCTATTATCTCGCGCGAAAGCGAGCGCCCTGA-  
TAACTATTCTTCCGTATCAAAGCATCGATAATAATGG-  
GATTCATTTTCTGTAAAAAATCCAAGCGATCCGCTTCC-  
GAACTACGGGTTGACGTCAGTGGTCTGCTGTGTGCT-  
TTCTGTCAGAAAGGTTACAGAAACGAAAGTTGTCCGC-  
TAGTATTATCCAT

NNN: secuencia sentido NNN: secuencia antisentido  
NNN: espaciador

Para el silenciamiento del gen *p25* de CTV (NC\_001661.1:16155-16826) se diseñó el siguiente ARNi<sub>hp</sub>:

ATGGACGACGAAACAAAGAAATGAAGAACAAAAACA-  
GGAACAAAAGAAGGCGACGATGTTGTTGCTGCCGAGTC-  
TTCTTTCAGTTCGGTAAACTTACACATCGATCCGACTTTGA-  
TAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACCCAACAGAAC-  
GCTGCTTTGAACAGAGACTTATTCCTTACTTTGAAAGGGAA-  
GCATCCTAACTTACCTGATAAAGATAAGGACTTTCGCATA-  
GCTATGATGTTGATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATT-  
CAAAGCGATGACGACGCGGATATAACGTACACTCGGGA-  
GGGTGTTGAAGTGGATTTGTCTGACAAACTTTGGACTGAC-  
GTCGTGTTAACTCTAAGGGTATTGGTAACCGTACTAGTAT-  
GTTTTCTTTCTTTTTAAATGCTTGAGATTAATTTGGT-  
GATTTTCATTATTTCTTTCAAGAAAGTTCCTCATGGGA-

GGACTACTCCTTTTCATTTTGAGTGCAGATAGTACGGT-  
TACCAATACCCCTTAGAGTTAAACACGACGTCAGTCCAAA-  
GTTTTGTAGACAAAATCCACTTCAAACCCCTCCCGAGT-  
GTACGTTATACCCGTGGCGTCGTCATCGCTTTGTAAT-  
GATGAACTCTTAACTGCTAAACGATACAACATCATAGC-  
TATGCGAAAGTCCTTATCTTTATCAGGTAAGTTAGGAT-  
GCTTCCCTTCAAAGTAAGGAATAAGTCTCTGTTCAAA-  
GCAGCGTTCTGTTGGGTACTCAACTGACGCACATCGTT-  
CATCGTTATCAAAGTCCGATCGATGTGTAAGTTTACG-  
GAACTGAAAGAAGACTCGGCAGCAACAACATCGTCGCC-  
TTCTTTTGTTCCTTGTTTTGTCTTCAATTTCTTTGT-  
TTCGTCGTCAT

NNN: secuencia sentido NNN: secuencia antisentido  
NNN: espaciador

Es ampliamente aceptado que el silenciamiento me-  
diado por ARN explica muchos casos de defensa  
genética ante infecciones virales en las plantas. La  
ribointerferencia es inducida por ARN bicatenario  
o ARN monocatenario altamente estructurado, los  
que sufren una degradación específica de secuencia  
generando ARN de interferencia pequeños (ARNsi)  
de cadena doble de 21-25 nucleótidos. Una de las  
cadenas se acopla al complejo de silenciamiento in-  
ducido por ARN (RISC) y guía el clivaje o el bloqueo  
de la traducción de moléculas de ARN con comple-  
mentariedad (Soler *et al.*, 2012).

Todo el segmento de autocomplementariedad del  
inserto ARNi<sub>hp</sub> sirve como sustrato para la síntesis  
del ARNsi. A partir del espaciador prácticamente  
no se sintetizan ARNsi, pero la presencia de dicho  
espaciador tiene un efecto positivo en la eficiencia  
del silenciamiento, aún mayor si se emplea un intrón  
como espaciador (Watson *et al.*, 2005). Stoutjesdijk  
*et al.* (2015) compararon la eficiencia del silencia-  
miento postranscripcional empleando tres cons-  
tructos diferentes: cosupresión, ARN<sub>hp</sub> y ARNi<sub>hp</sub>.  
Los constructos ARNi<sub>hp</sub> fueron 25% más eficientes  
que los de ARN<sub>hp</sub>, donde el espaciador no contiene  
las secuencias de reconocimiento para el procesa-  
miento post-transcripcional. Además, la reducción  
del tamaño del espaciador lo haría menos propenso  
a sufrir el ataque de nucleasas, lo que podría resultar  
en una mayor expresión sostenida del ARN dúplex.  
Febres *et al.* (2008) emplearon constructos obtenidos  
a partir de CP, *p23*, *p27*, la ARN polimerasa depen-  
diente de ARN (traducible) y el UTR 3' (3END) para  
inducir el silenciamiento de los genes virales. Estos  
autores obtuvieron una línea totalmente resistente  
transformada con el constructo 3END. Estos cons-  
tructos no eran ARNi<sub>hp</sub>, por lo que resultaría plau-

sible considerar que la eficiencia de silenciamiento de los constructos de ARNihp pueda ser mayor.

Así, Soler *et al.* (2012) introdujeron constructos de ARNihp basados en los genes *p20*, *p23* y *p25* en *C. aurantifolia*. Con esta metodología obtuvieron tres líneas completamente resistentes a la infección por CTV. Resulta relevante resaltar que la resistencia mediada por ribointerferencia es dependiente de la identidad de secuencia entre los constructos transgénicos y la cepa infectante de CTV. Entonces, la utilización de la región más conservada del genoma viral supondría una ventaja, debido a la posibilidad de conferir resistencia a varias cepas de CTV con constructos únicos. Los genes *p20*, *p23* y *p25* están relativamente conservados, por lo que representan buenos candidatos para inducir resistencia de amplio espectro (Soler *et al.*, 2012). Es importante señalar que estas investigaciones no emplearon la técnica CRISPR/Cas9 para la inserción de los constructos génicos. Mediante CRISPR/Cas9, se podría lograr la integración dirigida en sitios convenientes del genoma, lo que podría incrementar la eficiencia del silenciamiento.

Teniendo en cuenta todos estos factores, se diseñó un constructo génico para la edición genómica mediante el sistema CRISPR/Cas9 (Figura 1).

Este silenciamiento estaría dirigido mediante tres ARNsg expresados en casetes independientes bajo el control de un promotor U3 obtenido de *Arabidopsis thaliana* o de alguna especie de cítricos. Huang *et al.* (2020) obtuvieron una mayor eficiencia de edición empleando el promotor CsU6-2 que con AtU6. Esta relación podría ser semejante para los promotores U3. La nucleasa SpCas9 optimizada para su expresión en plantas se expresaría bajo el control de un promotor de la Polimerasa II (PolII) y un terminador fuerte para prevenir la interferencia de esta enzima con la transcripción de los casetes de ARNsg.

En este caso el inserto quedaría bajo el control del promotor del gen de *actina*, por lo que no es necesario la inclusión de un nuevo promotor.

El sistema CRISPR/Cas permite la introducción de secuencias al genoma mediante la inducción de la reparación por recombinación homóloga en el sitio de corte en presencia de una plantilla de ADN. Según Collonnier *et al.* (2017), se han obtenido eficiencias de inserción mediada por recombinación homóloga de hasta el 36% y se han insertado constructos de hasta 3,1 kb. Para ello, la plantilla de ADN debe contener dos brazos de homología, izquierdo y derecho, flanqueando la secuencia de ADN donador. De acuerdo con los genes propuestos en este trabajo, la secuencia a insertar puede ser uno de los constructos de silenciamiento de genes virales o de los péptidos antimicrobianos. El constructo además contiene dos casetes de expresión de ARNsg, los cuales dirigen la inserción de la plantilla.

La mayoría de los constructos de ARNihp introducidos en dicotiledóneas han sido expresados bajo el control del promotor 35S del cauliflower mosaic virus (Watson *et al.*, 2005). Khalid *et al.* (2017) señalan que además de emplear promotores de expresión en todos los tejidos pueden emplearse promotores específicos de los tejidos blanco del virus, como el floema. CTV es un virus limitado al floema. Luego de infectar una célula acompañante o parenquimatosa se replica y puede entonces infectar un grupo de células adyacentes. De esta manera, no involucra a células no floemáticas por lo que no es necesaria la expresión de los constructos ARNihp en células no floemáticas. Por esta razón, se podrían emplear promotores específicos de floema, como CsSUS1p, AtPP2, CsPP2, AtSUC2, RSs-1, rolC, RTBV.

En este trabajo se propone un enfoque para obtener plantas resistentes a CTV, mediante la inserción de tres constructos codificantes para ARN en horquilla



**Figura 1.** Constructo génico para la inserción mediada por recombinación homóloga en el genoma de *Citrus sinensis*. Compuesto por dos casetes de ARNsg, que dirigen la inserción de este y dos secuencias de homología (BH: brazos de homología), que dirigen la reparación mediada por homología en un exón del gen regulador codificante para actina. La Nucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes* estaría bajo el control de un promotor de la Polimerasa II (PolII). Ter: terminador de la transcripción; U3: Promotor U3 de *Arabidopsis thaliana* u otro promotor funcional en cítricos.

con espaciador intrónico (ARNihp) en el gen codificante para la actina, empleando el sistema CRISPR/Cas. Esto permitiría silenciar los genes virales supresores de los mecanismos de ribointerferencia de las plantas infectadas. De esta manera, los mecanismos antivirales naturales de la planta podrán actuar sobre el resto de los componentes virales. La inserción de los constructos de los ARNihp sería mediada por CRISPR/Cas9, lo cual no se ha realizado hasta la fecha.

En resumen, en este trabajo se realizó un estudio de los genes candidatos para la edición genómica de especies de cítricos de interés comercial, empleando el sistema CRISPR/Cas. Se identificaron los genes promisorios para la transformación y se realizaron los diseños de ARNsg para el silenciamiento o la inserción de secuencias. Finalmente, se propuso una estrategia para el desarrollo de líneas resistentes a CTV. Estudios posteriores son necesarios para confirmar la eficacia de la estrategia propuesta en este manuscrito.

## CONCLUSIONES

La edición genómica vía CRISPR/Cas se propone como una estrategia promisoriosa para enfrentar la enfermedad de la tristeza de los cítricos. Luego de una revisión sistemática de la literatura, los genes virales *p20*, *p23* y *p25* fueron identificados como blanco para silenciar efectores virales esenciales en la evasión de las defensas de la planta. Además, se diseñaron tres constructos de ribointerferencia para su inserción en el gen de *actina* vía CRISPR/Cas9.

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

**Análisis formal, conceptualización:** Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz, Alán Rivero Aragón

**Investigación, metodología, conservación de datos:** Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz, Dalain Morciego Estévez, Alán Rivero Aragón

**Supervisión:** Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz, Alán Rivero Aragón

**Validación y visualización:** Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz, Dalain Morciego Estévez, Sandra Pérez Peláez, Alán Rivero Aragón

**Redacción – borrador original:** Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz, Dalain Morciego Estévez, Sandra Pérez Peláez, Alán Rivero Aragón

**Redacción - revisión y edición:** Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz, Alán Rivero Aragón

## BIBLIOGRAFÍA

- ABUTINEH, M., PIZZO, N., NIFAKOS, N., JIN, X., HARLIN, J.M. and ZHANG, X. 2021. Genomic analysis for *Citrus* disease detection. *OBM Genetics*, 5(1): 124–142.
- AMBRÓS, S., GÓMEZ-MUÑOZ, N., GIMÉNEZ-SANTAMARINA, S., SÁNCHEZ-VICENTE, J., NAVARRO-LÓPEZ, J., MARTÍNEZ, F., DARÒS, J. A. and RODRIGO G. 2021. Molecular signatures of silencing suppression degeneracy from a complex RNA virus. *PLoS Computational Biology*, 17(6): e1009166.
- CASERTA, R., TEIXEIRA-SILVA, N. S., GRANATO, L. M., DORTA, S. O., RODRIGUES, C. M., MITRE, L. K., YOCHIKAWA, J. T. H., FISCHER, E. R., NASCIMENTO, C. A., SOUZA-NETO, R. R., TAKITA, M. A., BOSCARIOL-CAMARGO, R. L. and MACHADO, M. A. 2020. *Citrus* biotechnology: What has been done to improve disease resistance in such an important crop? *Biotechnology Research and Innovation*, 3(1): 95–109.
- CERVERA, M., ESTEBAN, O., GIL, M. and PEN, L. 2010. Transgenic expression in citrus of single-chain antibody fragments specific to *Citrus* tristeza virus confers virus resistance. *Transgenic Research*, 10: 1001–1015.
- ÇEVİK, B., LEE, R. F. and NIBLETT, C. L. 2012. *Agrobacterium*-mediated transformation of grapefruit with the wild-type and mutant RNA-dependent RNA polymerase genes of *Citrus* tristeza virus. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 36: 195–206.
- COLLONNIER, C., GUYON-DEBAST, A., MACLOT, F., MARA, K., CHARLOT, F. and NOGUÉ, F. 2017. Towards mastering CRISPR-induced gene knock-in plants: Survey of key features and focus on the model *Physcomitrella patens*. *Methods*, 121-122: 103–117.
- CONTI, G., XOCONOSTLE-CÁZARES, B., MARCELINO-PÉREZ, G., HOPP, H. E. and REYES, C. A. 2021. *Citrus* genetic transformation: An overview of the current strategies and insights on the new emerging technologies. *Frontiers in Plant Science*, 12: 768197.
- DOMÍNGUEZ, A., MENDOZA, A. H., DE GUERRI, J., CAMBRA, M., MORENO, P. and PEÑA, L. 2002. Pathogen-derived resistance to *Citrus*

- tristeza virus (CTV) in transgenic mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding*, 10: 1–10.
- FEBRES, V. J., LEE, R. F. and MOORE, G. A. 2008. Transgenic resistance to *Citrus* tristeza virus in grapefruit. *Plant Cell Reports*, 27: 93–104.
- HUANG, X., WANG, Y., XU, J. and WANG, N. 2020. Development of multiplex genome editing toolkits for citrus with high efficacy in biallelic and homozygous mutations. *Plant Molecular Biology*, 104: 297–307.
- IFTIKHAR, Y., AL-SADI, A. M. and ATTA, S. 2024. Editorial: *Citrus* viruses: pathogenicity, genetic variation and molecular biology. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1325570.
- KHALID, A., ZHANG, Q., YASIR, M. and LI, F. 2017. Small RNA based genetic engineering for plant viral resistance: Application in crop protection. *Frontiers in Microbiology*, 8: 00043.
- LI, Z., HE, Y., LUO, T., ZHANG, X., WAN, H. and REHMAN, A. U. 2019. Identification of key residues required for RNA silencing suppressor activity of p23 protein from a mild strain of *Citrus* tristeza virus. *Viruses*, 11 (9): 782.
- LIANG, G., ZHANG, H., LOU, D. and YU, D. 2016. Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Scientific Reports*, 6: 21451.
- LUIS PANTOJA, M. and PAREDES TOMÁS, C. 2020. Huanglongbing disease of citrus in Cuba. *Tropicsafe Newsletter*, 2: 1-5.
- SOLER, N., PLOMER, M., FAGOAGA, C., MORENO, P., NAVARRO, L., FLORES, R. and PEÑA, L. 2012. Transformation of Mexican lime with an intron-hairpin construct expressing untranslatable versions of the genes coding for the three silencing suppressors of *Citrus* tristeza virus confers complete resistance to the virus. *Plant Biotechnology Journal*, 10 (5): 597–608.
- STOUTJESDIJK, P. A., SINGH, S. P., LIU, Q., HURLSTONE, C. J., WATERHOUSE, P. A. and GREEN, A. G. 2015. hpRNA-mediated targeting of the *Arabidopsis* FAD2 gene gives highly efficient and stable silencing. *Plant Physiology*, 129 (4): 1723–1731.
- SUN, Y., ZHANG, L. and FOLIMONOVA, S. Y. 2020. *Citrus* miraculin-like protein hijacks a viral movement-related p33 protein and induces cellular oxidative stress in defence against *Citrus* tristeza virus. *Plant Biotechnology Journal*, 19 (5): 977–991.
- WATSON, J. M., FUSARO, A. F., WANG, M. and WATERHOUSE, P. M. 2005. RNA silencing platforms in plants. *FEBS Letters*, 579 (26): 5982–5987.
- YANG, Z., ZHANG, Y., WANG, G., WEN, S., WANG, Y. and LI, L. 2021. The p23 of *Citrus* tristeza virus Interacts with host FKBP-type Peptidyl-Prolylcis-Trans Isomerase 17-2 and is involved in the intracellular movement of the viral coat protein. *Cells*, 10 (4): 934.

**CITAR COMO:**

KAIRUZ, E., MORCIEGO, D., PÉREZ-PELAEZ, S. RIVERO-ARAGÓN, A. 2025. Edición genómica en *Citrus* L. para la resistencia a citrus tristeza virus. *Centro Agrícola*, 52 (2025) e2449



Artículo de **libre Acceso** bajo los términos de una *Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional*. Se permite, sin restricciones el uso, distribución, traducción y reproducción del documento, siempre que la obra sea debidamente citada.