



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Obtención de variedades vegetales con potencial
biomasa radicular incrementada a través de la técnica
CRISPR/Cas9**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Cristian Jonatan Martínez Vázquez

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. Leandro Alberto Núñez Muñoz

Ciudad universitaria, Cd. Mx., 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Datos del Jurado

1. Datos del alumno
Martínez
Vázquez
Cristian Jonatan
46 32 33 44
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311150180
2. Datos del tutor
Maestro en Ciencias
Leandro Alberto
Núñez
Muñoz
3. Datos del sinodal 1
Doctora
Martha Graciela
Rocha
Munive
4. Datos del sinodal 2
Doctora
Martha Patricia
Coello
Coutiño
5. Datos del sinodal 3
Doctora
Rosa Inés
González
Torres
6. Datos del sinodal 4
Biólogo
Mario Eduardo
Pérez
Hernández
7. Datos del trabajo escrito.
Obtención de variedades vegetales con potencial biomasa radicular incrementada a través de la técnica CRISPR/Cas9
69 p.
2019

Contenido

Índice

Resumen	7
Abstract	8
Introducción.....	9
Antecedentes.....	10
Objetivos	12
Hipótesis.....	12
Marco Teórico	13
1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
2. <i>Citrus x aurantifolia</i>	14
3. El cultivo de limón mexicano	15
4. La raíz.....	16
5. Óxido Nítrico (NO) y estrés abiótico	17
6. L-arginina en plantas y su metabolismo	19
7. Arginasas y arginasas vegetales	21
8. Sistema CRISPR/Cas9.....	22
9. Estructura de la enzima Cas9, variantes y ortólogos.....	22
Materiales y Métodos.....	25
1. Análisis filogenético e identificación de genes ortólogos de arginasas en limón mexicano (<i>Citrus x aurantifolia</i>):	25
2. Protocolos generales de biología molecular	25
2.1. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> :.....	25
2.2. Extracción de ADN genómico vegetal:.....	26
2.3. Transformación de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> mediante choque térmico:.....	26
2.4. PCR punto final.....	27
2.5. Ligación de insertos.....	27
2.6. Digestión con enzimas de restricción	28
3. Análisis del patrón de expresión del gen codificante para la enzima arginasa en limón mexicano (<i>Citrus x aurantifolia</i>):	29
3.1. Extracción de ARN	29

3.2. RT-qPCR	29
4. Selección de gRNAs para la edición del gen codificante para la enzima arginasa en <i>A. thaliana</i> y <i>Citrus x aurantifolia</i>	30
5. Clonación de gRNAs en el vector pBUN4U6SM:.....	31
6. Crecimiento y transformación de plantas:	32
6.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> :	32
6.2. Tratamiento de calor intermitente para el incremento en la eficiencia de Cas9 en <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
6.3. Limón mexicano (<i>Citrus x aurantifolia</i>):	34
7. Análisis de transformantes.....	35
7.1. Expresión de Cas9 mediante Western Blot	35
7.2. Determinación de líneas editadas usando endonucleasa T7	35
7.3. Análisis de la estabilidad de la edición en <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
Resultados y Discusiones	37
1. Identificación de ortólogos para arginasa en <i>C. aurantifolia</i>	37
1.1. Análisis bioinformático de los genes codificantes de arginasas.....	37
1.2. Identificación del gen ortólogo en <i>Citrus x aurantifolia</i>	39
1.3. Patrón de expresión de la arginasa de <i>C. aurantifolia</i>	42
2. Diseño y clonación de gRNAs en vectores plasmídicos	44
2.1. Diseño de gRNAs para <i>C. aurantifolia</i>	44
2.2. Diseño de gRNAs para <i>A. thaliana</i>	46
2.3. Construcciones de los plásmidos recombinantes pBUN4U6SM-ATARGAH2 E2, E5 y CsARGAH.....	49
3. Obtención de transformantes	51
3.1. Transformantes para la construcción AT ARGAH2 E2.....	51
3.2. Transformantes para la construcción AT ARGAH2 E5.....	51
3.3. Transformantes de <i>Citrus x aurantifolia</i>	52
4. Obtención y caracterización de las líneas editadas	54
4.1. Obtención de plantas editadas	54
4.2. Caracterización de las líneas editadas	56
Conclusiones:.....	61
Perspectivas	62
Referencias:	63

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1. Morfología de la Raíz	17
Ilustración 2. Metabolismo general de la L-Arginina en células vegetales	20
Ilustración 3. Estructura de la proteína de <i>S. pyogenes</i> Cas9	23
Ilustración 4. Árbol filogenético de las secuencias de arginasas de diferentes especies.	38
Ilustración 5. Alineamiento entre las arginasas de <i>C. sinensis</i> y <i>C. clementina</i>	39
Ilustración 6. Alineamiento de las proteínas arginasa 2 y 1 de <i>A. thaliana</i> y <i>C. sinensis</i> ,...	40
Ilustración 7. Amplificación de la región del exón 4 en muestras de ADN de <i>C. aurantifolia</i>	40
Ilustración 8. Cromatograma y secuenciación del exón 4 de <i>C. aurantifolia</i>	41
Ilustración 9. Blast realizados a la secuencia amplificada de <i>C. aurantifolia</i> en los genomas de <i>C. clementina</i> y <i>C. sinensis</i>	41
Ilustración 10. RT-qPCR para arginasa en tejidos de plántulas de <i>C. aurantifolia</i>	42
Ilustración 11. Estructura del gen codificante de arginasa en <i>C. sinensis</i>	44
Ilustración 12. Alineamiento del gRNA con otros organismos vegetales	46
Ilustración 13. Estructura del gen <i>argah2</i>	47
Ilustración 14. Diseño de gRNAs en Deskgen: gRNA del exón 2 <i>A. thaliana</i>	47
Ilustración 15. Diseño de gRNAs en Deskgen: gRNA del exón 5 <i>A. thaliana</i>	48
Ilustración 16. Mapa del vector pBUN4U6SM.....	49
Ilustración 17. Secuenciaciones de las cepas usadas.	50
Ilustración 18. Digestiones con HindIII	50
Ilustración 19. PCR de la línea 1 de la construcción AT ARGAH2 E2	51
Ilustración 20. PCR de las líneas de plantas transformadas positivas para la construcción AT ARGAH2 E5	52
Ilustración 21. PCR de Cas9 de los explantes transformados de <i>C. aurantifolia</i>	53
Ilustración 22. PCR de los explantes transformados amplificando <i>vird2</i>	54
Ilustración 23. Western Blot.....	55
Ilustración 24. Ensayo con endonucleasa T7	55
Ilustración 25. Secuenciación de las líneas editadas 1C, 2C y 4C	56
Ilustración 26. Amplificación de Cas9 en líneas editadas de la generación F3	58
Ilustración 27. Ediciones resultantes de la secuenciación de las líneas 1C y 2C.	58

Índice de Tablas

Tabla I. Mezcla de reacción para PCR punto final	27
Tabla II. Programa de temperaturas para PCR punto final	27
Tabla III. Mezcla de reacción para clonación en el vector T/A	28
Tabla IV. Mezcla de reacción para clonación con ligasa T7.....	28
Tabla V. Mezcla de reacción para digestión con enzimas de restricción	28
Tabla VI. Mezcla de reacción para RT-qPCR.....	30
Tabla VII. Programa de temperaturas para RT-PCR.....	30
Tabla VIII. Mezcla de alineamiento de oligonucleótidos	31
Tabla IX. Programa de alineamiento de oligonucleótidos para clonación de gRNA.....	31
Tabla X. Cronograma de temperaturas propuestas para el ensayo de incremento de eficiencia de edición del gen <i>argah2</i>	33
Tabla XI. Mezcla de reacción de alineamiento para la digestión con endonucleasa T7.....	35
Tabla XII. Condiciones para el alineamiento de oligonucleótidos.....	35
Tabla XIII. Lista de especies usadas en el análisis filogenético.....	37
Tabla XIV. Lista de especies en donde se encuentra conservado el gRNA diseñado para <i>C. aurantifolia</i>	45
Tabla XV. resumen del número de explantes usados y cálculo de la eficiencia de transformación.	53
Tabla XVI. secuencias sin mutar y mutadas	60

Resumen

La arginasa, es una enzima involucrada en el catabolismo de la arginina. Plantas silenciadas para los genes codificantes para arginasas, producen una mayor cantidad de óxido nítrico, lo cual puede generar en un fenotipo vegetal resistente a diferentes tipos de estrés abiótico e incrementos en el desarrollo de las raíces. El sistema CRISPR/Cas9 ha emergido como una herramienta de uso generalizado para provocar mutaciones genómicas en diferentes especies, debido a su facilidad de implementación y baja probabilidad de obtener cambios no específicos. El presente proyecto tuvo como objetivo editar el gen *argah2* de *Arabidopsis thaliana* y *Citrus x aurantifolia*, mediante la técnica CRISPR/Cas9. Entre los resultados obtenidos se destaca la identificación y filogenia de homólogos de arginasas en *C. aurantifolia*, el diseño de gRNAs para editar el gen *argah2* y *argah* en *A. thaliana* y *C. aurantifolia* respectivamente (entre otras especies), la obtención de transformantes en ambas especies, así como líneas de plantas editadas de *A. thaliana*. Estos resultados son pues el punto de partida para futuros estudios a fin de identificar las funciones de este gen en el genoma vegetal; así como para la obtención de variedades potencialmente tolerantes a estreses de tipo abiótico.

Palabras clave: arginasa, óxido nítrico, *Arabidopsis thaliana*, *C. aurantifolia*

Abstract

Arginase is an enzyme involved in the catabolism of arginine. Silenced plants for arginase coding-gene, produce higher amount of nitric oxide, which can generate a phenotype resistant to different types of stress and increases in the development of roots. The CRISPR/Cas9 system has emerged as a tool of generalized use to generate genomic mutations in different species, due to its ease of implementation and low probability of generating non-specific changes. The objective of this project was to edit the *argah2* gene of *Arabidopsis thaliana* and *Citrus x aurantifolia*, using the CRISPR/Cas9 technique. The results include the identification and phylogeny of arginase homologs in *C. aurantifolia*, the design of gRNAs to edit the *argah2* and *argah* gene in *A. thaliana* and *C. aurantifolia* (among other species), the obtaining of transformants in both species, as well as lines of edited plants of *A. thaliana*. These results are the starting point for future studies and to identify the functions of this gene in the plant genome; aside from obtaining a suitable variety of tolerant plants to abiotic stress.

Keywords: arginase, nitric oxide, *Arabidopsis thaliana*, *C. aurantifolia*, CRISPR-Cas9 editing.

Introducción

Convencionalmente los cultivos agrícolas han sido seleccionados artificialmente a través de métodos tradicionales como cruza, selección de parentales o mutaciones inducidas. La ingeniería genética ha permitido romper las barreras genéticas y fenotípicas inherentes a los métodos convencionales, permitiendo modificar genomas de manera más eficiente y precisa. Nuevas herramientas como el sistema CRISPR/Cas9, puede cambiar la forma en que se lleva a cabo el mejoramiento vegetal, pudiendo incorporar nuevas características u optimizar las existentes a un rubro agrícola determinado. (Khatodia *et al.*, 2016).

La raíz es el órgano vegetal encargado de dar soporte, almacenar carbohidratos, absorber agua y compuestos inorgánicos; así como percibir e iniciar algunas respuestas moleculares frente a estrés biótico y abiótico. Desde el punto de vista agronómico, un adecuado desarrollo radical promueve el crecimiento e incrementa la productividad, rendimiento y adaptabilidad a condiciones adversas como inundaciones, sequía o suelos poco fértiles (Shi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017).

Estudios recientes demuestran que un incremento en la concentración de óxido nítrico (NO), repercute en un incremento de la biomasa radical de plantas (Correa-Aragunde *et al.*, 2004) por lo cual este proyecto pretende obtener plantas mutantes para el gen de la arginasa.

La Arginasa (L-arginina ureahidrolasa) es una metalo-enzima de manganeso binuclear, que cataliza el paso inicial en la degradación de arginina (Winter *et al.*, 2015), esta enzima compite por el mismo sustrato que la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (Wang *et al.*, 2017). Lograr un knockout en este gen representaría una mayor cantidad de sustrato disponible para la enzima NOS aumentando los niveles de óxido nítrico en las raíces.

Ya que varios países en desarrollo, incluido México, resultan ser vulnerables a los efectos del cambio climático; en zonas impactadas por la sequía al noroeste del país e inundaciones en el Sureste, por fenómenos meteorológicos extremos, se ha documentado que el cambio climático trae consigo un incremento notable en la frecuencia y duración de las sequías asociadas a el fenómeno “El Niño” (SAGARPA y FAO, 2014). A través de la edición genética del gen codificante de arginasa, se podrían obtener variedades de estas plantas con una mayor biomasa radical, confiriéndoles distintas ventajas para tolerar condiciones de estrés abiótico a las que están sometidas en los campos de cultivo, como la sequía, además de que una mayor biomasa radical puede aumentar el rendimiento de la planta, mejorando el beneficio de las cosechas.

Antecedentes

En el año 2008 los genes de arginasa se habían caracterizado en *Arabidopsis thaliana* gracias al aporte de Brownfield y sus colaboradores, los cuales son: *argah1* (AT4G08900) y *argah2* (AT4G08870), demostraron que estos genes se expresan en tejidos como hojas cotiledonares y hojas verdaderas en crecimiento. Además, los autores demostraron a través de RT-qPCR, que los transcritos de *argah2*, pero no de *argah1*, se acumulaban en respuesta al jasmonato. En el mismo año Flores *et al.*, (2008) caracterizaron las líneas mutantes por inserción de T-ADN de los genes *argah1* y *argah2* y encontraron que estas plantas mostraban una actividad arginasa reducida y un incremento en la acumulación de NO, su fenotipo se caracterizaba por tener mayor longitud de raíces laterales y de raíces adventicias que los silvestres, por el contrario, la sobreexpresión de estos genes inhibía el desarrollo de raíces laterales; concluyendo que el knockout de estos genes produce un incremento en la biomasa radical.

En 2013 Shi y sus colaboradores estudiaron el impacto de los genes *argah1* y *argah2* de *A. thaliana* en respuesta que tienen ante el estrés abiótico a través de la manipulación de la expresión de dichos genes. En líneas mutantes se observó tolerancia a múltiples estreses abióticos incluyendo déficit hídrico, salinidad y congelamiento; mientras que las líneas sobreexpresoras exhibieron una tolerancia reducida en comparación con las plantas silvestres. Esta respuesta fue confirmada por cambios en la fuga de electrolitos, tasa de pérdida de agua, apertura estomática y tasa de supervivencia. Todos estos resultados permitieron concluir que los genes de arginasa regulan negativamente muchas tolerancias a estrés abiótico. Estos aportes indican que los genes codificantes de arginasa tienen un papel importante en el fenotipo de la planta que presenta un mayor desarrollo de raíces laterales y un incremento en la tolerancia al estrés abiótico.

Un reporte de edición de estos genes y en donde se obtiene fenotipos con mayor masa radical, lo presenta Wang y sus colaboradores en 2017, su equipo logró editar los genes codificantes de arginasas de *Gossypium hirsutum* (algodón) mediante CRISPR/Cas9. Los autores obtuvieron frecuencias de edición de entre 10-98% para los genes Gh_A05G2143 y Gh_D05G2397. Las plantas regeneradas mostraron inserciones de 1 bp o deleciones de 1-44 bp. Las líneas 24 y 28 mostraron incrementos (en un sustrato rico en nitritos) del 25% a 46% en el número de raíces laterales, y de 52% al 74% en el área total de las raíces. Asimismo, las líneas mostraron una disminución de la actividad de arginasas, aumento en la actividad de óxido nítrico sintasa y aumento la acumulación de óxido nítrico. Estos resultados sugieren que las ediciones causaron mutaciones que disminuyeron la actividad de las arginasas, estimulando la actividad de óxido nítrico sintasas, logrando inducir la síntesis de óxido nítrico que promueve el crecimiento lateral de las raíces.

Un caso de edición en cítricos, lo presentan los investigadores Jia y Wang en 2014 en donde utilizaron a *Xanthomonas citri subsp. citri*, como un pretratamiento antes del proceso de transformación de cítricos, promoviéndose así la expresión transitoria en tejido foliar convencionalmente recalcitrante al proceso de agroinfiltración. Con este método los autores logran transformar tejido de naranja para editar el genoma con el sistema de CRISPR/Cas9 junto con un gRNA para editar el gen PDS. La secuenciación de ADN confirmó que el gen fue mutado en el sitio de interés en las hojas infiltradas de naranja (*Citrus x sinensis*) siendo este el primer reporte de una edición genética mediante este sistema reportado en cítricos.

Años después Zhang y sus colaboradores en 2017 desarrollaron un sistema altamente eficiente de CRISPR/Cas9 que compone su expresión por el promotor YAO y un marcador bifuncional usado para identificar plantas transgénicas de *Citrus sp*, Logran una alta expresión de Cas9 y demostraron una mayor eficiencia usando este sistema al realizar una mutagénesis dirigida al gen PDS (fitoeno desaturasa) en *Citrus sp*. Transformaron epicotilos de “Carrizo Citrange”, (*Poncirus trifoliata x Citrus sinensis*) diseñaron 3 gRNA para editar el principio a la mitad y al final del gen PDS, obteniendo alrededor de 20 explantes transformantes, resultado de esto, el primer gRNA “258” produjo una alta frecuencia de plantas con fenotipo albino, un total del 65% que mostraron fenotipo mutante y 85% resultaron ser albinas, el gRNA 18349 produjo una alta frecuencia de plantas con fenotipo mutante (75%), mientras que el gRNA 13340 produjo la más baja frecuencia de fenotipos mutantes (45.5%), estos resultados sugieren que la actividad del promotor YAO, promueve la actividad del sistema CRISPR/Cas9 en eventos de mutación, probando que el promotor YAO es más efectivo en la eficiencia de edición de cítricos que el promotor CaMV 35S.

Objetivos

Objetivo General:

- Editar el gen *argah* de *Arabidopsis thaliana* y *Citrus x aurantifolia*, mediante la técnica CRISPR/Cas9

Objetivos Específicos:

- Identificar genes ortólogos codificantes para el gen de la arginasa en *C. aurantifolia*.
- Diseñar y clonar gRNAs en vectores plasmídicos que permitan la edición del gen codificante para la enzima arginasa en *A. thaliana* y *C. aurantifolia*
- Generar líneas transformantes de *A. thaliana* y *C. aurantifolia* para los genes codificantes de arginasas.
- Generar y caracterizar genotípicamente las líneas editadas que se obtengan.

Hipótesis

CRISPR/Cas9 es una técnica eficiente para la edición de genes, con este sistema se puede realizar una edición del gen codificante de arginasas *argah2* en *A. thaliana*, y la arginasa de *Citrus x aurantifolia*, provocando que el DNA sea reparado por medio de una reparación no homóloga, provocando mutaciones aleatorias y causando un corrimiento en el marco de lectura del gen logrando un knockout efectivo del gen de la arginasa en las plantas estudiadas en este proyecto. Las plantas que tengan el gen de la arginasa en knockout, presentarán un aumento en la acumulación de óxido nítrico, promoviendo el crecimiento de raíces laterales, este fenotipo les conferirá a las plantas una mejor capacidad de tolerar condiciones de estrés abiótico

Marco Teórico

1. *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana es parte de la familia Brassicaceae y clasificación taxonómica de acuerdo a Jhonson y Bouchez (2007), es:

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Infrareino: Streptophyta

Superdivisión: Embriophyta

División: Traqueophyta

Subdivisión: Spermatophyta

Clase: Magnoliopsida

Superorden: Rosaceae

Orden: Brassicales

Familia: Brassicaceae

Género: *Arabidopsis*.

A. thaliana posee características genéticas y biológicas, que la hacen un particular modelo de estudio para la investigación en la biología de plantas, ya que tiene un tamaño relativamente pequeño, tiene un ciclo de vida rápido y es extremadamente prolífera, la especie en general es autógama, pero puede fácilmente ser cruzada y producir poblaciones híbridas, estas ventajas son muy prácticas para la experimentación genética, lo que lo hace una planta bastante versátil (Jhonson y Bouchez, 2007). Otra de las ventajas de la especie es la facilidad que tiene para llevar a cabo transformaciones genéticas, empleando *Agrobacterium tumefaciens*. Además, la especie desde el punto de vista genético posee un genoma de los más simples conocidos hasta ahora, contando con 5 pares de cromosomas (2n=10) y un total de 125 megabases, lo cual es particularmente favorable en estudios moleculares genéticos y de experimentación genómica (Jhonson y Bouchez, 2007). Toda la familia puede ser fácilmente reconocida por la arquitectura simple de su flor y en la mayoría de los casos las flores muestran cuatro pétalos formando una cruz, pero en algunos casos está reducida o carecen de esta (Koch *et al.*, 2008). En tanto a su distribución, existen nueve especies de *Arabidopsis* distribuidas primariamente en Europa, con dos que se extienden por el norte hasta el este de Asia y uno en Norteamérica, estas especies son: *A. thaliana*, *A. suecica*, *A. arenosa*, *A. neglecta*, *A. croatica*, *A. cebennensis*, *A. pedemontana*, *A. lyrata*, *A. halleri* (AI-Shehbaz y O' Kane, 2002).

2. *Citrus x aurantifolia*

C. aurantifolia es parte de la familia de las Rutáceas y está comprendida en la siguiente clasificación (ITIS, 2019):

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Infrareino: Streptophyta

Superdivisión: Embriophyta

División: Traqueophyta

Subdivisión: Spermatophyta

Clase: Magnoliopsida

Superorden: Rosaceae

Orden: Sapindales

Familia: Rutaceae

Género: *Citrus*.

El género *Citrus* comprende algunas de las especies de árboles frutales de relevancia económica mundial. Es nativo de zonas cálidas situadas en el sur y sudeste de Asia y zonas templadas de China, Australia e Islas del Pacífico sudoccidental, con una larga historia de domesticación (Scora, 1975). Moore (2001) hace una revisión de la taxonomía del género *Citrus* y dando un panorama histórico encuentra que Swingle en 1943, había propuesto un sistema para el género *Citrus*, en donde contemplaba 10 especies, además menciona que Tanaka, en 1954, clasificó alrededor de 147 especies de cítricos. Sin embargo, la clasificación de la taxonomía de cítricos basada en los rasgos morfológicos y geográficos se vuelve complicada debido a que el género presenta características que hacen difícil su clasificación, tales como: la localización de sus centros de origen y diversidad, la hibridación que presenta el género, la amplia dispersión y escasez de ejemplares silvestres. Otro factor que dificulta su clasificación es la biología reproductiva del género ya que muchos cítricos se reproducen asexualmente mediante embrionía nucelar, es un tipo de apomixis en donde el embrión, procede directamente de una célula somática del interior del óvulo de la planta madre lo que genera clones de la planta. Sin embargo, a mediados de 1970, Barret y Rhodes desarrollaron un estudio filogenético que evaluó 146 rasgos morfológicos, además de otras características de los órganos de las plantas. Este estudio sugirió que solo tres tipos de cítricos constituyen al menos tres especies válidas para el género, *C. medica*, *C. reticulata* y *C. maxima*, los demás

cítricos se sitúan dentro de estas especies ya que son híbridos de estas tres especies (Moore, 2001).

La especie *C. aurantifolia* (Christm.) es una clasificación hecha por Swingle en 1943 que comprende a las limas dulces y ácidas, de las cuales existen dos tipos, frutos pequeños de origen mexicano y frutos largos de origen pérsico. Las limas son uno de los biotipos de *Citrus* que se cree que se generaron por apomixis. Moore (2001) explica que Barrett y Rhodes sugieren que los limones probablemente se originaron a partir de una cruce intergénica trihíbrida, en el cual las especies involucradas en esta cruce fueron *C. medica*, *C. grandis* y *Microcitrus*.

3. El cultivo de limón mexicano

Los cítricos son frutos de alto consumo en México y uno de los principales productos de exportación. Cada uno tiene sus características que los distinguen; por ejemplo: México es el segundo exportador de limón a nivel mundial con 12.29% del valor de las exportaciones mundiales; la naranja fue el cultivo perenne con la mayor superficie sembrada en 2016, con 335,336 hectáreas, y México es el tercer productor mundial de toronja (SAGARPA. 2016).

Está representada por tres principales variedades cultivadas; estas son: limón (*Citrus x latifolia*), limón mexicano, verde o amargo (*Citrus x aurantifolia*) y limón amarillo o italiano (*Citrus x lemon*). El cultivo de limón representa una gran importancia para el consumo nacional y es uno de los frutos de mayor exportación. Actualmente, los estados con mayor producción son: Veracruz, Michoacán, Oaxaca y Colima, que aportan alrededor del 75 % de la producción nacional, estados como Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca se dedican especialmente a la producción de limón mexicano para abastecer el mercado nacional. La superficie de limón mexicano es de 80 mil hectáreas ocupadas en gran medida por Michoacán y Colima, con el 80% del área ocupada para este cultivo. Los estados con mejores rendimientos son Sonora y Tamaulipas con 22 y 19.5 toneladas por hectárea, respectivamente (INTAGRI. 2018).

La baja productividad del cultivo se debe a una serie de factores, como son: los daños por plagas y enfermedades algunas que las afectan son: la enfermedad del huanglongbing (HLB) o dragón amarillo que causa pérdidas importantes en su aparición y es una fuerte amenaza para las explotaciones. (INTAGRI, 2018); antracnosis, ocasionada por el hongo *Colletotrichum acunitatum* y *C. gloesporioides*. Mancha Foliar, ocasionada por el hongo *Alternaria sp.* Virus de la tristeza de los cítricos (VTC). Entre otras varias, de origen biótico. Actualmente existe una gran superficie cultivada bajo temporal, sin ningún sistema de riego, por lo que depende de lluvias y se usan terrenos con bajo potencial productivo, muchas zonas con potencial no son desarrolladas de manera adecuada o no se explotan al máximo por falta de conocimiento (INTAGRI. 2018).

4. La raíz

La raíz es un órgano generalmente subterráneo que cumple diferentes funciones como la fijación de la planta al substrato, absorción de agua y nutrientes, así como almacenamiento de carbohidratos. La mayoría de las plantas dicotiledóneas poseen un sistema radical axonomorfo con ramificaciones de 2°- 5° orden y con crecimiento secundario. (Raven, 2013)

Desde el punto de vista anatómico, la raíz se compone de (Ilustración 1):

- Caliptra o Cofia: es una cubierta de células protectora del meristemo apical, en la zona central de la caliptra esta la columnela y una porción lateral que cubre a la columnela, además de esto libera una sustancia mucilaginosa (compuesta por polisacáridos) y células del borde que se convierte en un lubricante que protege de agentes dañinos y previene la desecación.
- Zona apical: es en donde se encuentra el meristemo apical que está formado por una zona de células iniciales; es la región que esta activamente dividiéndose y originará el resto de las células en la raíz, lo que dará paso a la epidermis, vasos conductores y tejido fundamental, próximo a las células iniciales se localiza el centro quiescente, una región relativamente inactiva del meristemo apical.
- Zona de elongación: es la parte de la raíz de unos pocos milímetros de longitud, es en donde las células se elongan resultando en el incremento en la longitud de la raíz.
- Zona de maduración: es la región en donde la mayoría de las células de los primeros tejidos empiezan a madurar, las células empiezan a ser funcionales y forman los tejidos primarios de la raíz, también en esta región se forman los pelos radicales por diferenciación de las células epidérmicas.
- Epidermis: consiste en una capa de células elongadas con paredes pequeñas que carecen de cutícula y ofrecen una pequeña resistencia al paso del agua y minerales en la raíz, la absorción de estos es facilitada por los pelos radiculares.
- Córtex: es una capa de células que ocupa la mayor parte del cuerpo primario de las raíces, estas células tienen plastidios que comúnmente sirven para el almacenamiento de almidones y generalmente están desprovistas de clorofila, también pueden quedar lignificadas, además este tejido tiene numerosos espacios intercelulares por los que circula el agua absorbida por los pelos y por la epidermis.
- Endodermis: es la capa más interna del córtex, está formada por una capa de células compactas con paredes primarias impregnadas de suberina, las cuales forman una cinta denominada banda de Caspary, Es una barrera a la difusión que controla las sustancias que llegan del exterior a los haces vasculares.
- Periciclo: está constituida por un par de capas celulares, de células parenquimáticas, de paredes delgadas y estas conservan su capacidad meristemática, a partir de estas se forman primordios radiculares y dan lugar a las raíces laterales.
- Haz vascular: en el centro de la raíz se encuentran los tejidos vasculares, el xilema y floema (Evert y Eichhorn, 2013; Megías *et al.*, 2018).

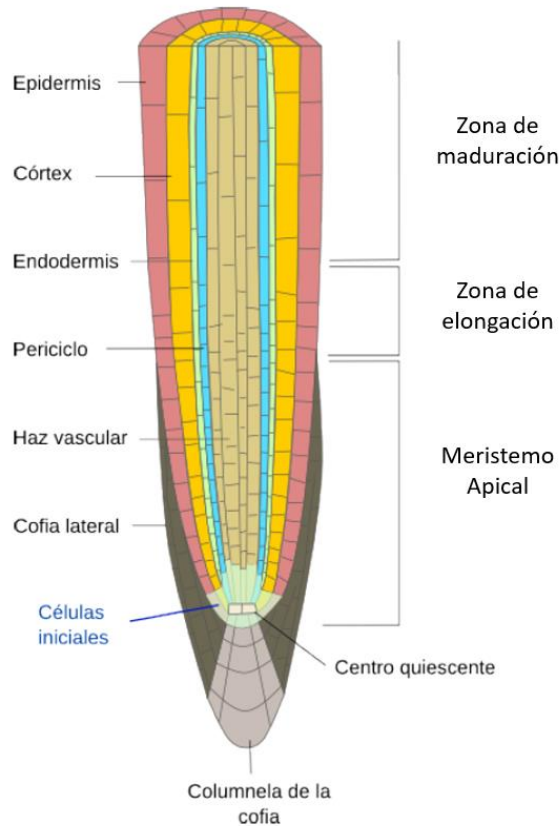


Ilustración 1. Morfología de la Raíz, Fuente: Megías *et al.*, 2018.

5. Óxido Nítrico (NO) y estrés abiótico

El óxido nítrico (NO) es un gas inorgánico tipo radical libre, diatómico, incoloro, poco soluble en agua, altamente permeable en membranas biológicas; que actúa como molécula señalizadora en organismos procariontas y eucariontas. En plantas, el NO interviene en diferentes procesos incluyendo fotosíntesis, floración, maduración, germinación, orientación del tubo polínico, modulación de la actividad de algunas enzimas, modificaciones postraduccionales (por ejemplo, S-nitrosilación), regulación del cierre estomático, muerte celular, etc. Diferentes tipos de estrés como la alta irradiancia, deficiencia de nutrientes, UV, ozono, altas o bajas temperaturas, shock osmótico, salinidad, daño mecánico, presencia de patógenos y herbivoría; pueden iniciar la síntesis de NO (Khan *et al.*, 2014; Maurya y Rani, 2017).

Adicionalmente, el NO también posee un papel importante en la organogénesis de la raíz, donde la promoción o inhibición del desarrollo radical depende de las concentraciones de NO y de las condiciones ambientales abióticas. Por ejemplo, un incremento en las concentraciones de NO es iniciado por la deficiencia de nutrientes como magnesio, fósforo, hierro o nitratos en *A. thaliana*, *Lupinus albus* y *Oryza sativa*; estimulando en todos los casos el desarrollo radical (Correa *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2017).

La molécula, puede sintetizarse por dos vías:

- La vía reductiva: mediada por la enzima nitrato reductasa citosólica, óxido nítrico reductasa de membrana o nitrito reductasa mitocondrial; siendo la primera una de las principales fuentes de NO en plantas (Khan *et al.*, 2014; Astier *et al.*, 2017).
- La vía oxidativa: involucra moléculas como L-arginina, poliaminas e hidroxilaminas que sirven como sustratos para la producción de NO (Sun *et al.*, 2017). La ruta que utiliza L-arginina, genera NO por la actividad de una enzima similar a la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), quien cataliza la conversión de L-Arginina a L-Citrulina y NO, requiriendo oxígeno y NADPH como cofactores (Messner *et al.*, 2009; Fröhlich y Durner, 2011; Astier *et al.*, 2017).

En plantas no se han identificado las enzimas responsables de esta reacción a excepción de la microalga *Ostreococcus tauri* (Foresi *et al.*, 2010). Experimentos realizados con inhibidores selectivos de la NOS de animales o con L-arginina marcada en especies como *Lycopersicon esculentum*, *A. thaliana*, *Trifolium repens*, *Oryza sativa*, *Scutellaria baicalensis*, *Zea mays*, *Camellia sinensis*, *Chorispora bungeana*, *Mucuna hassjoo*, *Lupinus albus*, *Glycine max*, *Kalanchoe daigremontiana*, *Nicotiana* sp. y *Taxus* sp.; proveen evidencia que sustenta la hipótesis de que la L-arginina tiene un papel en la producción de NO en plantas (Sun *et al.*, 2017; Flores *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que existe presencia de NO y moléculas derivadas en las raíces, destacando así su importancia durante el desarrollo de la raíz, del mismo modo, también se ha reportado la presencia de otras moléculas derivadas, como la S-nitrosoglutación y el peroxinitrito, en las raíces de varias especies de plantas como la pimienta, el chicharo y *Arabidopsis*, lo que indica que las raíces tienen un metabolismo activo de NO. A través del uso de donadores exógenos de NO, se ha visto que la molécula participa en la inducción de la elongación de la punta de las raíces y la formación de raíces laterales y adventicias. Al parecer el NO exógeno puede afectar la expresión de los genes que regulan el ciclo celular y modulan la síntesis de celulosa, así como también la composición de la lignina, adicionalmente la aplicación de NO exógeno puede mediar las respuestas de auxinas durante la formación de raíces adventicias en plántulas de pínos (Corpas y Barroso, 2015).

Se ha reportado que plantas mutantes para los genes de arginasa presentan un incremento en las concentraciones de óxido nítrico, esto aumenta su crecimiento radical, lo cual incrementa el área y número de raíces laterales y adventicias, además de que potencialmente pueden mejorar el rendimiento y el desarrollo radical (Flores *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2017). Además, son capaces de resistir diferentes tipos de estrés abiótico mejor que las plantas silvestres, tal como el estrés salino, desecación y congelamiento (Shi *et al.*, 2013).

Sin embargo este aumento en la tolerancia al estrés abiótico también se puede ver influenciada por un aumento de las concentraciones en poliaminas, se reporta que mutantes de arginasas presentan un aumento en los niveles de agmatina iminohidrolasa (AIH), N-carbamoylputrecina amidohidrolasa (NLP1) y arginina descarboxilasa 1 y 2 (ADC1, ADC2) lo cual indica que ambos genes de arginasas *argah1* y *argah2* pueden regular de forma

negativa la tolerancia al estrés abiótico y modificar los niveles de poliaminas a través de la ruta de la descarboxilación de la arginina. Las poliaminas y el NO pueden tener un complejo mecanismo para lidiar con especies reactivas de oxígeno y otras respuestas celulares derivadas del estrés ambiental (Shi *et al.*, 2013).

6. L-arginina en plantas y su metabolismo

La arginina es un aminoácido que forma parte de proteínas, que participa en el transporte y almacenamiento de nitrógeno o como precursor de la síntesis de poliaminas, prolina y óxido nítrico en organismos vegetales. también tiene el papel como nutraceutico, biomarcador y micronutriente. (Cunin *et al.*, 1986; Slocum, 2005; Winter *et al.*, 2015; Pubchem, 2019).

La ruta anabólica de la arginina tiene lugar en el cloroplasto y se inicia con la síntesis de L-ornitina a partir de glutamato, en un proceso cíclico donde intervienen varios intermediarios acetilados (Ilustración 2) (Slocum, 2005). La L-ornitina producida puede usarse como fuente para tres principales procesos metabólicos: la biosíntesis de esperminas, la biosíntesis de prolina y la biosíntesis de arginina en el ciclo de la urea (Cunin *et al.*, 1986; Winter *et al.*, 2015).

En mamíferos se ha reportado que la L-prolina actúa como un agonista débil de receptores de glicina (Henzi *et al.*, 1992). En las plantas la acumulación de la prolina es una respuesta fisiológica común hacia varios tipos de estrés como la alta salinidad, sequía, patógenos, deficiencia de nutrientes, entre otros, también es parte del desarrollo de tejidos regenerativos como el polen (Verbruggen y Hermans, 2008).

Las poliaminas a partir de la arginina como la espermina son esenciales para el desarrollo de respuestas hacia el estrés en las plantas, otros procesos como la embriogénesis organogénesis, la floración y el desarrollo de los frutos, así como la senescencia de hojas, requieren de poliaminas (Winter *et al.*, 2015). A nivel celular las poliaminas interactúan con varias macromoléculas y membranas, muestran uniones a los fosfolípidos y afectan la rigidez de la membrana, también promueven la polimerización de componentes del citoesqueleto, influyen en la conformación y estabilidad del ADN y activan el complejo ribosomal durante la síntesis de proteínas (Imai *et al.*, 2004).

Posteriormente, se dan las siguientes reacciones enzimáticas que permiten la conversión de L-ornitina a L-arginina:

- 1) La ornitina transcarbamilasa (OTC) carbamila el grupo δ -amino de la L-ornitina a partir de carbamoil fosfato, formando L-citrulina. La molécula de carbamoil fosfato es generada previamente a partir de ATP y L-glutamina mediante una reacción catalizada por la enzima carbamoil fosfato sintetasa (CPS).
- 2) La argininosuccinato sintasa (ASS) liga una molécula de aspartato a la L-citrulina en presencia de ATP, generándose L-argininosuccinato y AMP.
- 3) La arginina succinato liasa (ASL) separa el fumarato de la molécula de argininosuccinato, generando así la arginina (Shargool *et al.*, 1988; Cunin *et al.*, 1986; Slocum, 2005; Winter *et al.*, 2015)

Por otra parte, la ruta catabólica de arginina puede producirse por la acción de tres enzimas diferentes: la arginina descarboxilasa (ADC) que convierte la arginina a agmatina, óxido nítrico sintasa (NOS) que convierte la arginina a citrulina y óxido nítrico o por la arginasa (ARGAH) que convierte la arginina a ornitina y urea (Shargool *et al.*, 1988; Borek *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2013; Winter *et al.*, 2015). Se ha reportado que la citrulina puede influenciar dos procesos fisiológicos en las plantas, el transporte de nitrógeno y el mantenimiento de la osmolaridad celular durante el estrés abiótico y también funciona como almacenamiento de nitrógeno (Joshi y Alisdair, 2017). La ornitina es un intermediario requerido para la biosíntesis de arginina y también es utilizado en la biosíntesis de otros productos secundarios como alcaloides y poliaminas (Shargool *et al.*, 1988), adicionalmente la acumulación de ornitina en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, muestran una alta tolerancia a la salinidad y a la sequía (Winter *et al.*, 2015). La urea tiene el papel como la fuente primaria de nitrógeno y es tomada activamente por las plantas a través del suelo, pero también es un intermediario del catabolismo de la arginina producto de la actividad de la arginasa, este proceso se involucra con la removilización del nitrógeno a otros tejidos de la planta (Witte, 2010; Winter *et al.*, 2015).

La ruta catabólica mediada por la arginasa (Ilustración 2) se inicia con el transporte de la L-arginina a la mitocondria por los transportadores BAC1 y BAC2. Una vez dentro, se produce la degradación de la L-arginina a L-ornitina y urea por acción de la arginasa. La urea es exportada al citosol donde es luego degradada a amonio por acción de la enzima ureasa; mientras que la L-ornitina puede ser transportada nuevamente a los plastidios para reingresar a la biosíntesis de L-arginina (Shargool *et al.*, 1988; Winter *et al.*, 2015).

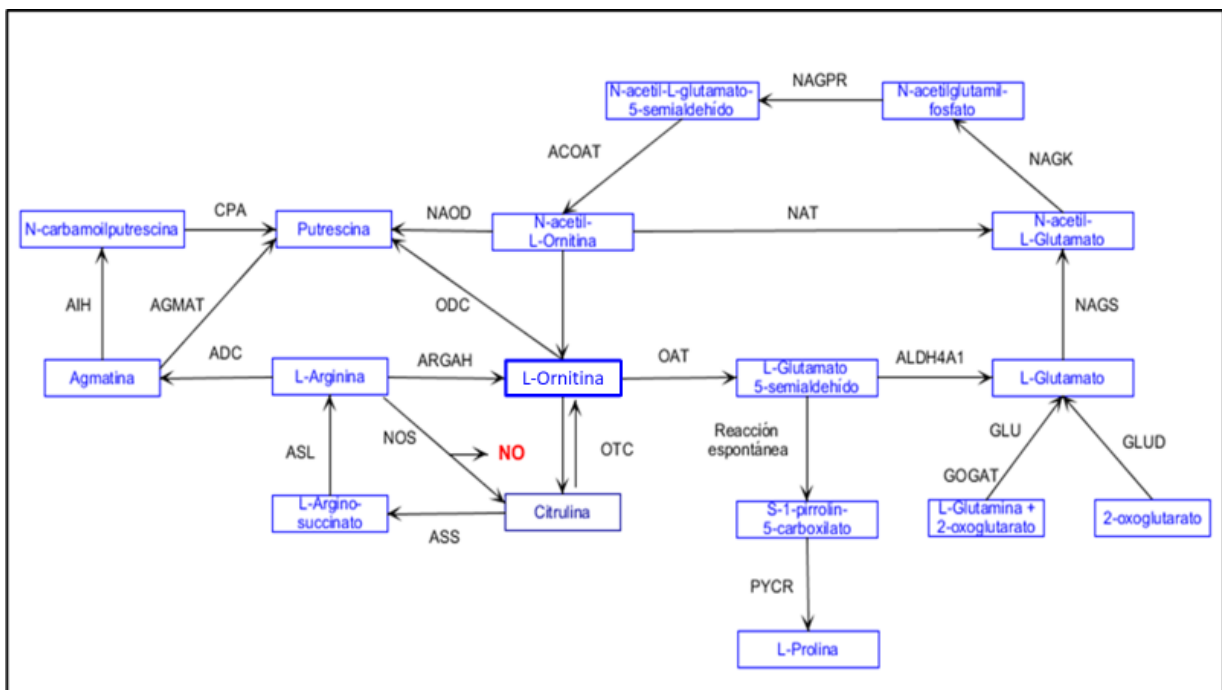


Ilustración 2. Metabolismo general de la L-Arginina en células vegetales

7. Arginasas y arginasas vegetales

La arginasa (L-arginina ureahidrolasa o amidinohidrolasa, EC 3.5.3.1.) es una enzima homotrimérica mitocondrial que cataliza la hidrólisis de L-arginina a L-ornitina y úrea. La L-ornitina es un precursor para la síntesis de poliaminas y prolina. Cada subunidad contiene un sitio activo, y dos iones manganeso que actúan como cofactores (Wu y Morris 1998; Di Costanzo *et al.*, 2007). El principal rol fisiológico de la enzima arginasa ha sido asociado a la movilización de reservas de nitrógeno durante la germinación en calabaza, haba, soya, *Arabidopsis* y pino (Chen *et al.*, 2004).

En *A. thaliana*, los genes codificantes para arginasas presentan patrones de expresión que incluyen el tejido vascular de hojas cotiledonares, meristemos, radícula y polen. En el caso del polen, la actividad arginasa produce L-ornitina que es empleada para la síntesis de prolina y sus derivados como glicoproteínas ricas en hidroxiprolina que son necesarias para la extensión del tubo polínico (Brownfield *et al.*, 2008).

Adicionalmente, se ha reportado actividad arginasa en órganos florales, frutos inmaduros y raíces de tomate (*Solanum lycopersicum*), donde la arginasa pudiese estar involucrada en la producción de poliaminas. Algunas arginasas vegetales pueden ser inducibles por jasmonatos, daño mecánico o por la toxina coronatina (producida por la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae*) (Chen *et al.*, 2004).

Desde el punto de vista genómico, el número de copias de genes codificantes para arginasas difiere entre especies; presentándose una copia en monocotiledóneas mientras que en dicotiledóneas se agrupan en clúster de 2-4 miembros. *Pinus taeda* y *Oryza sativa* poseen una copia; *A. thaliana*, *A. lyrata*, *Capsella rubella*, *Lotus japonicus* y *Solanum lycopersicum* poseen dos copias; mientras *Triticum aestivum* tres copias y *Glycine max* 4 copias (Goldraij y Polacco, 1999; Brownfield *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2004). Los genes codificantes para arginasas vegetales están ampliamente distribuidos, e interesantemente todos poseen una estructura de 6 exones y la mayoría poseen secuencias de localización mitocondrial en su extremo N-terminal (Chen *et al.*, 2004).

Sin embargo, la sobreexpresión de arginasas ha sido correlacionada con una tolerancia a patógenos y plagas como las larvas del lepidóptero *Manduca sexta* en tomate o contra *Botrytis cinerea* en el caso de *A. thaliana*. En ambos casos, se asocia la resistencia obtenida con un incremento en la síntesis de poliaminas debido a la sobreproducción de ornitina, producto de la sobreexpresión de la arginasa (Zhang *et al.*, 2014, Winter *et al.*, 2015).

8. Sistema CRISPR/Cas9

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR), junto con las endonucleasas asociadas tipo Cas, forman el complejo CRISPR/Cas. Este complejo, se encuentra naturalmente en bacterias y arqueas proporcionándoles un mecanismo de inmunidad adaptativa contra bacteriófagos y plásmidos. La proteína asociada Cas9 de CRISPR es una endonucleasa que necesita de una secuencia guía que conforma un dúplex de ARNs (tracrRNA o trans-activador CRISPR y crRNA o crisprRNA), para formar pares de bases con una secuencia diana de ADN y poder realizar una rotura de doble hebra en un sitio específico del ADN. Este dúplex tiene dos características: una secuencia en el extremo 5' que determina el ADN objetivo en el sitio donde ocurre el emparejamiento y en el extremo 3' el cual se une a la endonucleasa Cas9 (Doudna y Charpentier, 2014; Lammoglia *et al.*, 2016).

Típicamente el ARN guía está conformado de una secuencia de 20 nucleótidos con la siguiente fórmula: N₂₀(nucleótidos)-NGG (PAM), para dirigir a la endonucleasa Cas9 al sitio de interés. Tras el corte, la célula repara el ADN por medio de una recombinación homóloga o no homóloga, la primera usa un templado de ADN molde y la segunda puede provocar deleciones y/o inserciones en el ADN, dentro de los genes y como consecuencia las plantas editadas cambian la expresión de las proteínas ya sea de forma disfuncional o con menor actividad (Khatodia *et al.*, 2016).

La programación de CRISPR-Cas9, junto con un mecanismo de escisión de ADN y la existencia de muchas variantes de sistemas naturales tipo II CRISPR-Cas, ha permitido desarrollos notables utilizando este método. Las ventajas que proporciona este sistema es que permite un fácil diseño del material genético, es relativamente más económico que otras técnicas de edición genética, es eficiente al momento de localizar y modificar secuencias genéticas. Por estas razones, el sistema CRISPR/Cas9 se ha vuelto una de las tecnologías con un gran potencial dentro de la ingeniería genética y actualmente se siguen estudiando sus posibles alcances y aplicaciones en diversos ámbitos dentro del campo de la biotecnología (Lammoglia *et al.*, 2016; Doudna y Charpentier, 2014).

9. Estructura de la enzima Cas9, variantes y ortólogos.

La proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* o “SpCas9” es una enzima multifuncional monomérica con un peso de 160 KDa, compuesta por 6 diferentes dominios, de los cuales dos dominios tienen actividad endonucleasa: la subunidad HNH es responsable de la digestión de la hebra complementaria tres nucleótidos adyacentes al PAM y el dominio similar a RuvC que rompe la hebra no complementaria en una región de 3 a 8 nucleótidos adyacentes al PAM (Anders *et al.*, 2015; Doudna y Charpentier, 2014; Lammoglia *et al.*, 2016).

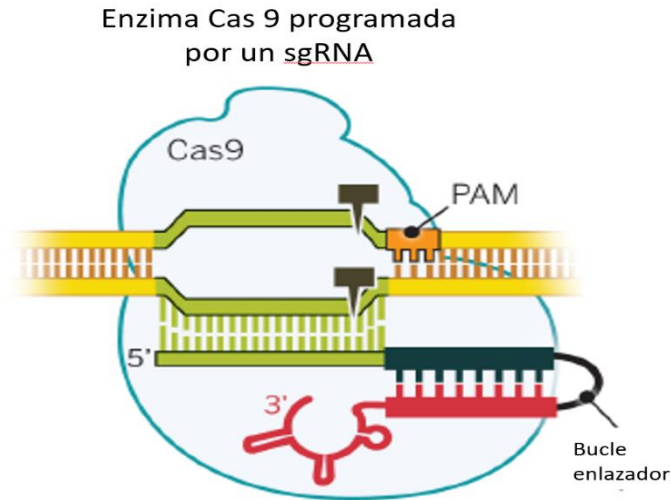


Ilustración 3. Estructura de la proteína de *S. pyogenes* Cas9.
Fuente: Doudna y Charpentier, 2014.

Existen otras variantes que proporcionan diferentes aplicaciones biotecnológicas, algunas de estas son:

1. nCas9, proteína cas9 inactiva en un dominio catalítico: esta variante posee actividad endonucleasa solamente en una hebra del ADN, debida a una sustitución del residuo de ácido aspártico 10 o histidina 840 por una alanina, este cambio inactiva el dominio RuvC o HNH respectivamente. Si el corte es reparado por recombinación homóloga, la edición puede ocasionar una sustitución. Cabe mencionar que otra ventaja de esta variante es que al seleccionar dos gRNAs que sean cercanos y dispuestos en hebras complementarias, se aumenta la eficiencia de edición y reduce el reconocimiento de las secuencias fuera del blanco (Ran *et al.*, 2013).
2. dCas9, Cas9 en estado inactivo: Cas9 se encuentra modificada para que su actividad nucleasa sea deficiente, permitiéndole dirigirse al sitio de interés sin necesidad de que haga un corte en la hebra de ADN, por lo que la tecnología puede usarse como una herramienta de regulación génica secuencia-específica, no-mutagénica. Fundamentalmente, se inducen mutaciones al gen de Cas9 de *S. pyogenes*, para modificar sus dos dominios HNH y RuvC con el propósito de inactivarlos, el resultado es una nucleasa incapaz de cortar al ADN, pero retiene la característica de unirse al ADN cuando es guiado por un sgRNA. dCas9 permite una directa manipulación de los procesos de transcripción sin alterar genéticamente la secuencia de ADN al fusionarse con otras proteínas efectoras (Domínguez *et al.*, 2016).
3. Ribozima-gRNA-Ribozima (RGR): es una variante a la técnica aplicada del Sistema Cas9, pero en este caso es un gen artificial el que genera la secuencia de ARN que contiene secuencias de ribozimas, que se someten a escisión autocatalizada para generar el gRNA deseado tanto *in vitro* como *in vivo*, el RGR puede ser transcrito de cualquier tipo de promotor y por lo tanto permite una edición específica del genoma y la detección eficiente de mutaciones (Khatodia *et al.*, 2016).

Justificación

Plantas con mutaciones en los genes codificantes para arginasas, tienden a desarrollar una mayor biomasa radicular, debido a un incremento en las concentraciones de óxido nítrico. Este aumento estimula el crecimiento y formación de raíces laterales, incrementando la biomasa radicular de la planta y confiriéndoles mayor productividad y rendimiento; así como tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico incluyendo el déficit hídrico, salinidad, poca disponibilidad de nutrientes y estrés por bajas temperaturas. Además de producir plantas con una mejorada tolerancia al estrés abiótico, a su vez también se generará material editado para comprender y estudiar el papel de la arginasa en la fisiología de las plantas, además de identificar el gen codificante de arginasa en la especie de *Citrus x aurantifolia*, ya que no está reportado en las bases de datos.

Con la técnica CRISPR/Cas9 se podrían inducir *knockouts* en el gen codificante para arginasa, obteniendo plantas con mayor biomasa radical, confiriéndoles ventajas para tolerar las condiciones de estrés abiótico que se presentan en el campo, en un ambiente afectado por el cambio climático, no solamente aplicable al cultivo de limón mexicano en México, también abriendo la posibilidad a poder editar el gen en otras especies de cítricos y posiblemente a otras especies de importancia económica para la agricultura. Adicionalmente, se pueden seleccionar plantas editadas sin transgenes y homocigotas para la edición durante las generaciones de segregantes, estas plantas están libres de transgenes y con la modificación deseada y esto permitiría que las plantas editadas no entraran en la regulación de la LBOGM.

Materiales y Métodos

1. Análisis filogenético e identificación de genes ortólogos de arginasas en limón mexicano (*Citrus x aurantifolia*):

Se utilizó el programa MEGA-X, para elaborar un árbol filogenético entre las especies emparentadas con *C. aurantifolia* y *A. thaliana*, se usó una especie relativamente lejana de la familia, para enraizar el árbol, se utilizó la base de datos del NCBI para obtener información y de la herramienta en línea BLAST para identificar arginasas homólogas entre cítricos y arginasas codificantes en *A. thaliana*. Se utilizaron 20 secuencias proteicas diferentes de arginasa de 20 especies distintas de plantas emparentadas con las especies estudiadas, para armar una filogenia de arginasas e identificar los genes homólogos para *C. aurantifolia*, el método de alineamiento usado fue el algoritmo de ClustalW y Neighbor-Joining para reconstruir el árbol con 500 réplicas o bootstraps.

Se realizó un BLAST entre las arginasas de *C. sinensis* y *C. clementina* para corroborar que el gen de la arginasa estuviera conservado en ambas especies, después se realizó un alineamiento entre la secuencia de aminoácidos de la arginasa de *A. thaliana* y *C. sinensis*, para encontrar sitios de interés que estuvieran conservados en ambas secuencias ya que la arginasa de *A. thaliana* tiene los sitios reportados de acuerdo con Chen y colaboradores, 2004, tanto sitios de manganeso como de unión a sustrato, posteriormente con los sitios de interés identificados en la arginasa de *C. sinensis* se diseñaron oligonucleótidos que permitiesen amplificar una región conservada del homólogo de *argah2* en el género *Citrus*. Tras amplificar las secuencias en muestras de ADN de *C. aurantifolia*, aquellas con el tamaño esperado, fueron purificadas a partir de un gel de agarosa al 0.8% empleando Zymoclean Gel ADN Recovery Kit de Zymo Research™, clonados en el vector pCR®2.1/GW/TOPO® y después introducidos por choque térmico en *E. coli* MACH1-T1. Las colonias resultantes fueron analizadas por digestión con EcoRI y PCR con los oligonucleótidos específicos para el inserto y aquellas colonias positivas fueron posteriormente secuenciadas por el método de Sanger (Servicio de Secuenciación UBIPRO FES-Iztacala, UNAM) a fin de obtener secuencias molde para el diseño de los gRNAs.

2. Protocolos generales de biología molecular

2.1. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*:

Para las extracciones de ADN fueron utilizadas colonias de *E. coli* almacenadas en viales de glicerol al 15% a -80 °C o de colonias aisladas y crecidas en placas de medio LB (10 g/L de bacto triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl, y para LB-agar se usaron 15 g/L de bactoagar) con antibióticos (100 mg/L de espectinomicina; pCR®8/GW/TOPO® o pBUN4U6SM; 50 mg/L de kanamicina: pCR®2.1/GW/TOPO®). Se inocularon 3 ml de medio LB líquido con el antibiótico pertinente y se incubaron en agitación (160-220 rpm) a

37 °C toda la noche. Se centrifugó el medio de cultivo a 9600 g's por 1 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 250 µl de Solución I (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0, RNAsa 100 µg/µl). Se le adicionaron 250 µl de Solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezcló por inversión y se añadió 300 µl de Solución III (acetato de potasio 5M, ácido acético glacial 11.5%), mezclando nuevamente por inversión y se centrifugó por 10 min a 18800 g's. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se le añadieron 0.7 volúmenes de isopropanol preenfriado a 4 °C, se mezcló y se centrifugó a 18800 g's por 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y se lavó dos veces la pastilla con 500 µl de etanol al 70% preenfriado a 4 °C, mezclando y centrifugando por 5 min a 18800 g's. Se dejó secar el tubo incubándolo a 55 °C por 10 min o hasta que la base del tubo estuviera totalmente seca. La pastilla fue resuspendida en 30 µl de agua estéril Milli-Q. Posteriormente las muestras fueron cuantificadas en un NanoDrop™ One (ThermoFisher Scientific, WA) y la integridad del ADN fue revisada en geles de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio (0.1 µg/ml)

2.2. Extracción de ADN genómico vegetal:

100 mg de tejido foliar fueron congelados en nitrógeno líquido y pulverizados en un homogeneizador de tejidos TissueLyser a 50 Hz durante 2 min. Tras la pulverización las muestras se incubaron con 600 µl de CTAB Buffer (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, NaCl 1.4 M, CTAB 2%, PVP 4000 1%) a 65°C por 20 min a 300 rpm. El homogenato se mezcló en vórtex con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se centrifugó a 9600 g's durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se mezcló con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó nuevamente a 9600 g's durante 15 min a 4 °C y al sobrenadante se le añadieron 0.7 volúmenes de isopropanol preenfriado a 4 °C y se mezcló por inversión. La pastilla obtenida tras centrifugación a 9600 g's por 15 min se lavó dos veces con etanol al 70% preenfriado a 4 °C y se secaron los tubos a 55°C durante 10 min, resuspendiendo el precipitado con agua Milli-Q estéril con RNAsa A (10 µg/ml). La integridad del ADN fue verificada en un gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio (0.1 µg/ml), la concentración fue determinada con un Nanodrop (ThermoFisher Scientific, WA).

2.3. Transformación de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* mediante choque térmico:

Se tomó un vial de células quimiocompetentes de *E. coli*, a las cuales se les añadieron 5 µl de reacción de ligación o 10-100 ng de ADN plasmídico y se incubaron en hielo por 20 min. Posteriormente el vial se incubó por 53 s a 42 °C, y luego en hielo por 2 min. Tras el choque térmico, se añadieron 250 µl de medio SOC (bactotriptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl, 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, glucosa 20 mM) y se incubó a 37 °C, a 225 rpm durante 1 h. Se sembraron 25 y 250 µl del cultivo, en placas de medio LB con el respectivo antibiótico y se incubaron a 37 °C toda la noche.

2.4. PCR punto final

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con el kit de amplificación manual de PCR (PCR amplification Kit Manual de TaKaRa™) siguiendo los volúmenes señalados en la Tabla I y con las condiciones de termociclado señaladas en la Tabla II

Tabla I. Mezcla de reacción para PCR punto final

Componente	Volumen (µl)
H ₂ O estéril	c. b. p. 12.5
Buffer de PCR (100mM Tris-HCL, 500mM KCl, 15 mM, MgCl ₂)	1.25
dNTPs (2.5mM)	1
Primer Directo (≈ 10mM)	0.25
Primer Reverso (≈ 10mM)	0.25
Enzima Taq Polimerasa(5 U/µl)	0.05
ADN molde*	Variable

*Usar en cada reacción: 30 ng de ADN plasmídico o ADN genómico de *A. thaliana*, 100 ng de ADN plasmídico de *A. tumefaciens* o ADN genómico de *C. aurantifolia* o colonia directamente tomada de placas de petri de *E. coli*.

Tabla II. Programa de temperaturas para PCR punto final

Paso	Temperatura	Tiempo (min: s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	05:00	1
Desnaturalización	94 °C	00:35	
Alineamiento	Variable	00:35	
Extensión	72 °C	Variable (1 Kb/s)	30
Extensión final	72 °C	10:00	1
Enfriamiento	16 °C	∞	1

2.5. Ligación de insertos

Se purificaron los productos de PCR mediante el kit de purificación de geles de agarosa (Zymoclean Gel ADN Recovery Kit de Zymo Research™) o mediante el kit de purificación de productos de PCR (QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN). Posteriormente, se utilizó el producto purificado para la reacción de ligación y se incubó la reacción a 22 °C toda la noche. Para productos de PCR, se empleó la técnica de clonación T/A (TOPO® TA Cloning® Kit de Invitrogen™) (Tabla III) y para ligación de gRNAs se realizó una ligación con ligasa T4 (Tabla IV)

Tabla III. Mezcla de reacción para clonación en el vector T/A

Componente	Volumen (µl)
H ₂ O Milli-Q estéril	2.5
Producto de PCR purificado (100 ng/µl)	2.0
Solución de Sales (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl)	1.0
pCR 2.1/GW/TOPO (10 ng/µl plasmido ADN en: 50% glycerol, 50mM Tris-HCL, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1% Triton X-100, 100 µg/ml BSA fenol rojo.)	0.5
Volumen final	6.0

Tabla IV. Mezcla de reacción para clonación con ligasa T4

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer de reacción de ligasa 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 5 mM ATP	4.0
Plásmido linealizado	10-100 ng
Inserto	Variable (dependiendo de la relación molar deseada) *
ddH ₂ O estéril	cbp 19.5
Ligasa T4 (5 U/µl)	0.5

** Para calcular la relación molar, y determinar la concentración requerida de inserto, utilizar la herramienta NEBioCalculator (<http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>)

2.6. Digestión con enzimas de restricción

De forma general, las digestiones con enzimas de restricción EcoRI, HindIII y BsaI se realizaron como se señala en la Tabla V, incubando a 37 °C toda la noche

Tabla V. Mezcla de reacción para digestión con enzimas de restricción

Componente	Volumen (µl)
H ₂ O Libre de nucleasas	c. b. p. 20.0
Buffer 10X	2.0
Enzima de restricción	5 U
ADN plasmídico	3.0

3. Análisis del patrón de expresión del gen codificante para la enzima arginasa en limón mexicano (*Citrus x aurantifolia*):

3.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó a partir de diferentes órganos de plántulas de *C. aurantifolia* crecidas durante 3 semanas en oscuridad y dos semanas en luz en medio de germinación (MS sales y vitaminas, 30 g/L de sacarosa, 3.5 g/L de phytigel, pH 8) con fotoperiodo 16:8 (horas luz: horas oscuridad). Los órganos utilizados fueron: hoja, tallo, raíz, hoja cotiledonar, semilla germinada y semilla latente. Por cada muestra se tomaron 5 individuos y este pool fue tratado como una muestra, con tres réplicas cada una. La extracción se realizó utilizando el kit *Direct-zol RNA MiniPrep* de *Zymo Research*TM, siguiendo las especificaciones del fabricante. La integridad del ARN extraído fue visualizado en un gel desnaturalizante de agarosa al 1.4% en Buffer MOPS 1X (Buffer MOPS 10X: 41.86 g/L MOPS, acetato de sodio 4.1 g/L, 20 ml/L Na₂EDTA [0.5M, pH 7.5]), mezclando 1 µL de ARN extraído y 2 µL de Buffer de Carga de ARN 2X (95% formamida, 0.025% SDS, 0.025% azul de bromofenol, 0.025% xileno cianol FF, 0.025% bromuro de etidio, 0.5 mM EDTA) incubando a 65 °C por 15 min y luego en hielo por 2 min. Posteriormente, las muestras fueron revisadas por electroforesis por 50 minutos a 50 V y visualizadas bajo luz UV.

3.2. RT-qPCR

Se tomaron 100 ng de ARN de cada tejido por muestra y se determinaron los niveles de expresión del gen *argah* de *C. aurantifolia*, empleando los oligonucleótidos qPCR-CsARGAH-F (5'-AGA AACTTGTGCGTGCTTTGG-3') y qPCR-CsARGAH-R (5'-GCGGGTCGTTTAATTCTTTCCC-3') que amplifican un fragmento de 179 bp. Asimismo, se utilizó como gen normalizador el gen *GADPH* (Mafra. 2012; Kozera y Rapacz, 2013) empleando los oligonucleótidos qPCR CsGADPH-F (5'-TCTTGCCTGCTTTGAATGGA-3') y qPCR CsGADPH-R (5'- TGTGAGGTCAACCACTGCGACAT-3') los cuales amplifican un fragmento de 80 bp. Los oligos qPCR-CsARGAH se diseñaron empleando el software en línea Primer3Plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) con la configuración predeterminada para qPCR, tomando como referencia la secuencia nucleotídica de *Citrus sinensis* reportada en la base de datos del NCBI como ARN mensajero codificante para arginasa (Número de acceso: [XM_006490831.3](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_006490831.3)). Para realizar la RT-qPCR se utilizó el kit comercial “KAPA SYBR[®] FAST One-Step qRT-PCR Master Mix (2X) Kit” siguiendo las especificaciones del fabricante; en un volumen final de 10 µl por reacción (Tabla VI). El programa de amplificación de la RT-qPCR se realizó en un equipo StepOnePlusTM Real-Time PCR System de Applied Biosystems según se indica en la Tabla VII.

Tabla VI. Mezcla de reacción para RT-qPCR

Componente	Volumen (μl)
H ₂ O Libre de nucleasas	3.20
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix	5.00
Primer Directo (10 μM)	0.20
Primer Reverso (10 μM)	0.20
ROX High	0.92
ARN (100 ng/ μl)	1.00
KAPA RT Mix (50X)	0.20

Tabla VII. Programa de temperaturas para RT-PCR

Paso	Temperatura	Tiempo (min: s)	Ciclo
Síntesis de cADN	42 °C	05:00s	1
Activación de la enzima	95 °C	05:00	1
Desnaturalización	95°C	00:05	40
Alineamiento/extensión	60 °C	00:20	
Disociación y medición de la temperatura de fusión.	De acuerdo con la medición predeterminada del equipo		

Con los datos obtenidos se realizó un cálculo de expresión diferencial basado en el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001) a través de la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb})}$$

Donde: $-\Delta\Delta C_T$ es igual a la proporción obtenida de la relación entre los valores C_t del gen estudiado y los valores C_t del gen de referencia. $\Delta C_{T,q}$ es el valor de umbral de ciclo del gen estudiado y $\Delta C_{T,cb}$ es el valor de umbral del gen de referencia.

4. Selección de gRNAs para la edición del gen codificante para la enzima arginasa en *A. thaliana* y *Citrus x aurantifolia*

Para *A. thaliana*, se consideraron los niveles de expresión para los genes *argah1-2* reportados por Flores *et al.*, (2008) e información estructural obtenida de las bases de datos de Uniprot (Número de acceso: Q9ZPF5). Se diseñaron gRNAs para el gen *argah2* con el software en línea Deskgen (<https://www.deskgen.com/landing/>) y se eligieron aquellos gRNAs con el menor target-off y el mayor target-on.

En el caso de *C. aurantifolia*, primero se identificó el gen de la arginasa en el limón mexicano, se utilizó un BLAST para alinear secuencias homólogas de arginasas de las especies *C.*

sinensis y *C. clementina* y corroborar que estuvieran conservados, también se identificaron sitios de interés en la arginasa de *A. thaliana* reportados por Chen, *et al.*, 2004, y posteriormente se alinearon las secuencias de aminoácidos de la arginasa de *A. thaliana* y *C. sinensis* y observar si los sitios están conservados en ambas especies, el exón 4 es la región que tenía más sitios de interés y en la cual se decidió diseñar un gRNA, posteriormente se obtuvieron las secuencias molde durante la identificación del gen de la arginasa y se eligió una secuencia de 20 nucleótidos dentro del exón 4.

5. Clonación de gRNAs en el vector pBUN4U6SM:

Para clonar los gRNAs seleccionados, 3 µg de ADN del vector pBUN4U6SM (14,692 pb) (Núñez-Muñoz, 2017) fueron digeridos con BsaI-HF a 37°C toda la noche en un volumen final de 20 µl. El plásmido digerido fue purificado a partir de gel de agarosa al 0.8% utilizando el kit Zymoclean Gel ADN Recovery Kit de Zymo Research™

Los gRNA fueron sintetizados como oligonucleótidos complementarios, con los extremos compatibles con el corte que realiza BsaI para ligarlos al ADN, con las secuencias 5'-ATTGG(N)₁₉-3' para el oligonucleótido directo y 5'-C(N)₁₉CAAA-3' para el oligonucleótido reverso. Estos oligonucleótidos se alinearon preparando una reacción de alineamiento y puesto bajo un programa de temperaturas que se presentan en las Tablas VIII y IX.

Tabla VIII. Mezcla de alineamiento de oligonucleótidos

Componente	Volumen (µl)
Oligonucleótido A (100 µM)	1.0
Oligonucleótido B (100 µM)	1.0
Buffer de alineamiento 10X (Tris-HCl 100mM pH 8.0, NaCl 500mM, EDTA 10mM)	2.0
ddH ₂ O estéril	16.0

Tabla IX. Programa de alineamiento de oligonucleótidos para clonación de gRNA

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	ΔT(°C/s)
94	5	-3.0
94-84	-	-2.0
84-25	-	-0.2
16	∞	-3.0

Tras el alineamiento, se realizó una mezcla de ligación de los fragmentos utilizando el Kit Rapid ADN Ligation, (Thermo Scientific®) tal como se especifica en el apartado 2.5. Una vez efectuada la mezcla de ligación se incubó a 22 °C toda la noche y 5 µL de la ligación se emplearon para transformar las células quimiocompetentes de *E. coli*

Una vez obtenidas las colonias, éstas fueron crecidas en medio LB con antibiótico, se les realizó extracción de ADN plasmídico y se analizaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos U6-F /gRNA-R (respectivos); así como a través de restricción con HindIII. Las colonias resultantes positivas a la PCR y con el patrón de digestión correcto, fueron secuenciadas para verificar la correcta inserción del gRNA en el vector binario. 1 µg de ADN plasmídico de una colonia verificadas mediante secuenciación, fue utilizados para la transformación de células electrocompetentes de *A. tumefaciens* AGL1. Se efectuó el choque eléctrico utilizando una cubeta de 0.1 cm (BIORAD) a 1800 V, 15 µF 335 R en un equipo electroporador EquiBio EasyJect Optima (Ashford, UK). Posteriormente, la mezcla se colocó en un microtubo y se le añadió 250 µL de medio SOC y esta se incubó a 28 °C por 2-3 h. Después se sembraron 5 y 20 µL del cultivo en medio LB-agar con espectinomicina (50mg/L), carbenicilina (50mg/L) y kanamicina (25mg/L) y se incubaron las colonias a 28 °C por 2-3 días. Después de cultivar las colonias se dejaron crecer en medio LB líquido con los mismos antibióticos selectivos y se incubó de nuevo a 28 °C por 2-3 días. Posteriormente, se extrajo ADN plasmídico de las colonias cultivadas como se indicó en el apartado 2.1, con la modificación de añadir a la Solución I lisozima de pollo (1 mg/ml). Posteriormente se realizó PCR con los oligonucleótidos U6p-F(5'-CCTGGGAATCTGAAAGAAGAG-3') y el respectivo gRNA-R. Una colonia positiva de *A. tumefaciens* AGL1, se almacenó en crioviales con glicerol al 15% a -80 °C.

6. Crecimiento y transformación de plantas:

6.1. *Arabidopsis thaliana*:

Se utilizaron semillas de *A. thaliana* ecotipo Columbia-0 silvestre, para que todas germinaran aproximadamente al mismo tiempo, las semillas fueron sincronizadas en agarosa al 0.05% a 4°C por 2 días. Las semillas fueron sembradas a razón de 5 semillas por maceta con una mezcla estéril de tierra: turba: agrolita (1:1:1), y colocadas en una cámara de crecimiento a 22 °C, con fotoperiodo 16:8 (horas luz: horas oscuridad) y regadas cada tercer día con solución nutritiva Miracle Growth®.

La transformación de *A. thaliana* se efectuó con el método de floral dip, de acuerdo con lo descrito por Clough y Bent (1998). Se usaron plantas de aproximadamente 2 meses de edad, a las que se les realizó una poda de tallos, flores abiertas y silicuas antes de la transformación. Se inoculó cada cepa de *A. tumefaciens* AGL1 con el plásmido recombinante pBUN4U6SM-ATARGAH2-E2 o pBUN4U6SM-ATARGAH2-E5 en 3 ml de medio LB3A (LB + carbenicilina 100 mg/L + kanamicina 50 mg/L + espectinomicina 100 mg/L), y se incubó a 28 °C por 2 días a 180 rpm. Después se inoculó 1 ml del cultivo crecido en 200 ml de medio LB3A y este se incubó a 28 °C por 24 h a 180 rpm, hasta alcanzar una $DO_{600nm}=1.5-2.0$. Los cultivos se centrifugaron a 1575 g's por 15 minutos a temperatura ambiente y se suspendieron las células en 400 ml de medio de infiltración (sacarosa 5%, 0.044 µM BAP, 200 µl/L de

Silwet L-77) ajustando la DO_{600nm} entre 0.8 y 1.0. Para la transformación se sumergieron los botones florales en esta solución durante 30-40 s, las plantas se colocaron horizontalmente en una bandeja de plástico amplia y se cubrieron con papel húmedo y plástico durante 48 horas. Posteriormente se regresaron a las condiciones habituales de crecimiento hasta que las silicuas empezaron a tornarse marrones; punto en el cual se detuvo el riego y tras 3 semanas se colectaron las semillas.

Las semillas obtenidas se sincronizaron en agarosa al 0.05% durante 3-5 días y se sembraron en bandejas con la misma mezcla estéril de tierra. Tras una semana luego de la siembra se inició la selección de transformantes mediante aspersiones semanales de las plántulas con glufosinato de amonio (1:6000) durante 3 o 4 semanas. Las plantas que sobrevivieron a la selección fueron trasplantadas a macetas individuales y posteriormente fueron analizadas, con PCR, amplificando una región de 424 bp del gen de Cas9 empleando los oligos Cas9-F (5'-CGGCCTCGATATTGGGACTAACTCT-3') y Cas9-R (5'-CTTATCTGTGGAGTCCACGAGCTTC-3') para comprobar la transformación.

6.2. Tratamiento de calor intermitente para el incremento en la eficiencia de Cas9 en *Arabidopsis thaliana*.

Con el fin de incrementar la eficiencia de edición de Cas9, se sometieron plantas transformadas de *A. thaliana* de la construcción para la edición de *argah2* en el exón E5, a un tratamiento intermitente de calor, de acuerdo con lo propuesto por LeBlanc *et al.*, (2018). Se germinaron semillas transformadas de la F2 de cada línea obtenida en medio ½ MS con 20 g/L de sacarosa, pH 5.8, y siguiendo el programa de temperaturas indicado en la Tabla X. Tras el tratamiento de calor, las plantas fueron trasplantadas a pellets de turba comprimida y se dejaron bajo condiciones normales de crecimiento colocadas en una cámara de crecimiento a 22 °C, con fotoperiodo 16:8 (horas luz: horas oscuridad).

Tabla X. Cronograma de temperaturas propuestas para el ensayo de incremento de eficiencia de edición del gen *argah2*.

Etapa	Duración
Estratificación	3d
Germinación	7d
Estrés por calor a 37 °C	30h
Crecimiento vegetativo °C	42h
Estrés por calor a 37 °C	30h
Crecimiento vegetativo °C	42h
Estrés por calor a 37 °C	30h
Crecimiento vegetativo °C	42h
Estrés por calor a 37 °C	30h
Recuperación del choque térmico	1 semana

6.3. Limón mexicano (*Citrus x aurantifolia*):

Se utilizaron epicotilos de *C. aurantifolia*, la transformación se realizó de acuerdo con lo propuesto por Dutt *et al.*, (2009) y Ghaderi (2018). Semillas extraídas de frutos frescos de *C. aurantifolia*, fueron desinfectadas con Tritón X-100 al 1% por 20 min y luego en cloro al 20% por 20 min, enjuagándolas posteriormente 3 veces con agua destilada estéril por 5 min cada lavado y dejándolas secar dentro de cajas Petri con servilletas estériles. Las semillas se sembraron en tubos con 20 ml de medio MS sin sacarosa pH 5.8, a razón de 2 semillas por tubo e incubándolas a 28 °C por tres semanas en oscuridad y una semana en fotoperiodo 16:8 (luz: oscuridad).

Una vez germinadas, los tallos de las plántulas se cortaron en segmentos de 1 a 1.5 cm de forma oblicua y se incubaron en medio CM líquido (medio MS con sales y vitaminas, 13.2 µM BAP, 0.5 µM NAA, 4.5 µM 2,4-D, 30g/L sacarosa, 0.5/L MES, pH 5.8) de 3 a 6 horas antes de la infección con *A. tumefaciens* AGL1 con el plásmido recombinante pBUN4U6SM-CsARGAH. Previamente se había crecido la cepa bacteriana en medio LB3A durante 2 o 3 días y se subcultivaron 2 ml del cultivo en 25 ml de medio LB3A con acetosiringona a 100 µM en agitación a 28 °C, hasta que alcanzara una $DO_{600nm} = 0.3$, el cultivo se centrifugo a 2050 g's durante 10 min y se resuspendió en 20 ml de medio CM.

Los explantes se cocultivaron con la bacteria 5 min y después fueron colocados en toallas de papel estériles para retirar el exceso de medio. Los explantes fueron transferidos a medio CM sólido (3.5 g/ de phytigel), y se incubaron por una semana en oscuridad a 28 °C. Posteriormente los explantes se transfirieron a medio RM (MS sales y vitaminas, 13.2 µM BAP 2.0 µM NAA, 0.5 g/litro MES, 30 g/L de sacarosa, 20 mg/L de glufosinato de amonio, 3.5g/L phytigel, pH 5.8) con antibióticos (100 mg/L de meropenem y 100mg/L de cefotaxime) para inhibir el crecimiento de *A. tumefaciens*. Los explantes se incubaron en medio RM por un mes en oscuridad, y posteriormente en luz con fotoperiodo 16:8 (luz: oscuridad), con recambios de medio cada 15 días. Los explantes que regeneraron brotes se transfirieron a cajas magenta con 50 ml de medio RMG (MS sales y vitaminas, 1 µM BAP, 2.89 µM GA3, 0.5 g/L MES, 25 g/L sacarosa, 20 mg/L de glufosinato de amonio, 3.5 g/L phytigel) durante 3 meses hasta haber obtenido el suficiente material vegetal para los análisis posteriores.

7. Análisis de transformantes

7.1. Expresión de Cas9 mediante Western Blot

Las líneas transformantes obtenidas fueron analizadas por Western Blot contra el epítipo 3X-FLAG que se encuentra fusionado a Cas9 en los vectores utilizados; empleando el anticuerpo Anti-3XFLAG M2 Peroxidase Monoclonal (SIGMA ALDRICH) producido en ratón, de acuerdo con las especificaciones del fabricante; utilizando el anticuerpo conjugado a peroxidasa a una dilución 1:1000. 100 mg de tejido foliar fueron utilizados para la extracción de proteínas utilizando 200 μ l de Buffer de Extracción de Proteínas frío (Tris-Cl 100 mM pH 6.8, SDS 2%, Glicerol 20%, DTT 200 mM, PMFS 1X) y cargando 30 μ l por muestra en geles de poliacrilamida al 12%.

7.2. Determinación de líneas editadas usando endonucleasa T7

Las líneas transformadas (*argah2*, exón 5) sometidas al tratamiento de calor, fueron analizadas a través del ensayo con endonucleasa T7, a fin de determinar posibles ediciones en el genoma. Primero, se amplificó un fragmento de 364 bp del gen que contiene el sitio de edición, mediante una PCR con los oligos ATARGAH2-E5-F (5'-ACATCACAATCTCTGG GAAAG-3') y ATARGAH2-E5-R (5'-ACGCATGTTAAATCATATTTCCG-3'). El producto se purificó empleando QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), y se llevó a cabo la restricción con la Endonucleasa T7 con los componentes y volúmenes indicados en la Tabla XI y después se realizó un alineamiento del producto de PCR con las condiciones mostradas en la tabla XII:

Tabla XI. Mezcla de reacción de alineamiento para la digestión con endonucleasa T7

Componente	Vf=19 μ l
ADN	200 ng
10X NEBuffer (250 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT.)	2 μ l
Agua destilada	a 19 μ l

Tabla XII. Condiciones para el alineamiento de oligonucleótidos

Etapas	Temperatura	Variación de temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	95 °C		5 minutos
Alineamiento	95-85 °C	-2°C/s	
	85-25 °C	-0.1 °C/s	
Enfriamiento	4 °C		

Posteriormente se añadió 1 µl de endonucleasa I T7 al producto de PCR alineado, la mezcla se incubo por 15 minutos a 37°C y después se procedió a terminar la reacción añadiendo 1.5 µl de EDTA 0.25 M. Por último, las muestras se visualizaron en un gel de agarosa al 5%.

Aquellas plantas positivas al ensayo con endonucleasa T7, se volvieron a reamplificar con el mismo juego de oligonucleótidos y el producto de PCR fue purificado a partir de un gel de agarosa al 0.8% empleando Zymoclean Gel ADN Recovery Kit de Zymo Research™, clonado en el vector pCR®2.1/GW/TOPO® y después introducidos por choque térmico en células quimiocompetentes de *E. coli* MACH1-T1. Las colonias resultantes fueron analizadas por digestión con EcoRI y fueron posteriormente secuenciadas por el método de Sanger (Servicio de Secuenciación UBIPRO FES-Iztacala, UNAM) a fin de determinar los cambios específicos que ocurrieron en la secuencia nucleotídica.

7.3. Análisis de la estabilidad de la edición en *Arabidopsis thaliana*.

La progenie de las plantas con ediciones caracterizadas en el apartado 7.2, se analizaron de forma similar mediante PCR y secuenciación utilizando plantas negativas a la presencia del transgén, a fin de obtener plantas con una edición heredable y a su vez, libres de transgenes.

En cuanto al análisis de transformantes de *C. aurantifolia*, se realizó una PCR para determinar la presencia del gen de Cas9. Luego, los explantes positivos a Cas9, fueron sometidos a una segunda PCR para verificar la presencia de un fragmento de 224 bp del gen virD2 de *A. tumefaciens* utilizando los oligonucleótidos virD2-F (5'-ATGCCCGATCGAGTCAAGT-3') y virD2-R (5'-TCGTCTGGCTGACTTTCGTCATAA-3') (Haas *et al.*, 1995). Posteriormente, aquellas plantas positivas a la presencia del transgén, pero negativas a la presencia del gen de *A. tumefaciens* fueron consideradas como transformantes putativas.

Resultados y Discusiones

1. Identificación de ortólogos para arginasa en *C. aurantifolia*

1.1. Análisis bioinformático de los genes codificantes de arginasas.

Flores y colaboradores, en 2018, reportaron que *A. thaliana* tiene dos genes codificantes de arginasas *argah1* y *argah2* éste último siendo el que tiene más actividad biológica. En el caso de *C. aurantifolia*, no se encontró ningún reporte acerca de los homólogos de arginasas en esta especie. Sin embargo, otras especies de cítricos como *C. sinensis* y *C. clementina*, poseen homólogos predichos de un gen codificante para arginasa. Con esta información, se realizó un análisis filogenético para la identificación del homólogo de *C. aurantifolia* y confirmar, si en especies de cítricos existe solo una copia del gen. Para esto se tomaron las secuencias proteicas de arginasas de 20 especies diferentes vegetales (Tabla XIII), usando la secuencia de arginasa de *Physcomitrella patens* para enraizar el árbol.

Especie	Numero de accesión (NCBI)
<i>Arabidopsis thaliana</i> 2	NP_192626.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_192629.1
<i>Citrus sinensis</i>	XP_015389741.1
<i>Citrus clementina</i>	XP_006445281.1
<i>Triticum aestivum</i>	AIE44771.1
<i>Zea mays</i>	AQK42314.1
<i>Oryza sativa</i>	ADK74000.1
<i>Brassica napus</i>	AAK15006.1
<i>Solanum lycopersicum</i>	NP_001234578.1
<i>Solanum lycopersicum</i> 2	NP_001233851.1
<i>Capsella rubella</i>	XP_006288117.1
<i>Capsella rubella</i> 2	XP_006288104.1
<i>Glycine max</i>	NP_001237121.2
<i>Gossypium hirsutum</i>	XP_016698236.1
<i>Spinacia oleracea</i>	XP_021864267.1
<i>Ricinus communis</i>	XP_002511686.1
<i>Jatropha curcas</i>	XP_012083598.1
<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	XP_020877484.1
<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i> 2	XP_020878486.1
<i>Physcomitrella patens</i>	XP_024376768.1

Tabla XIII. Lista de especies usadas en el análisis filogenético

Analizando el árbol filogenético (Ilustración 4) se identificaron 4 especies con dos genes reportados de arginasas: *C. rubella*, *A. thaliana*, *A. lyrata* y *S. lycopersicum*. Esto nos permite hipotetizar que en la familia *Brassicaceae* pudo haberse originado una duplicación génica que originó dichos genes, a excepción de *S. lycopersicum*, quien por su posición en el árbol tiene un clado aparte y pareciera que también tuvo su propia duplicación del gen. Además de que las arginasas 2, solo se agrupan en un clado, con especies de la familia *Brassicaceae*, otra observación es que efectivamente los cítricos están agrupados en su propio clado, con esto se aseguró que *argah2* es una duplicación y los cítricos solo tienen un gen de arginasas. Adicionalmente ya había reportado un estudio filogenético en donde indican que la divergencia de los genes *argah1* y *argah2*, ocurrieron independientemente a través de una duplicación (Brownfield *et al.*, 2018).

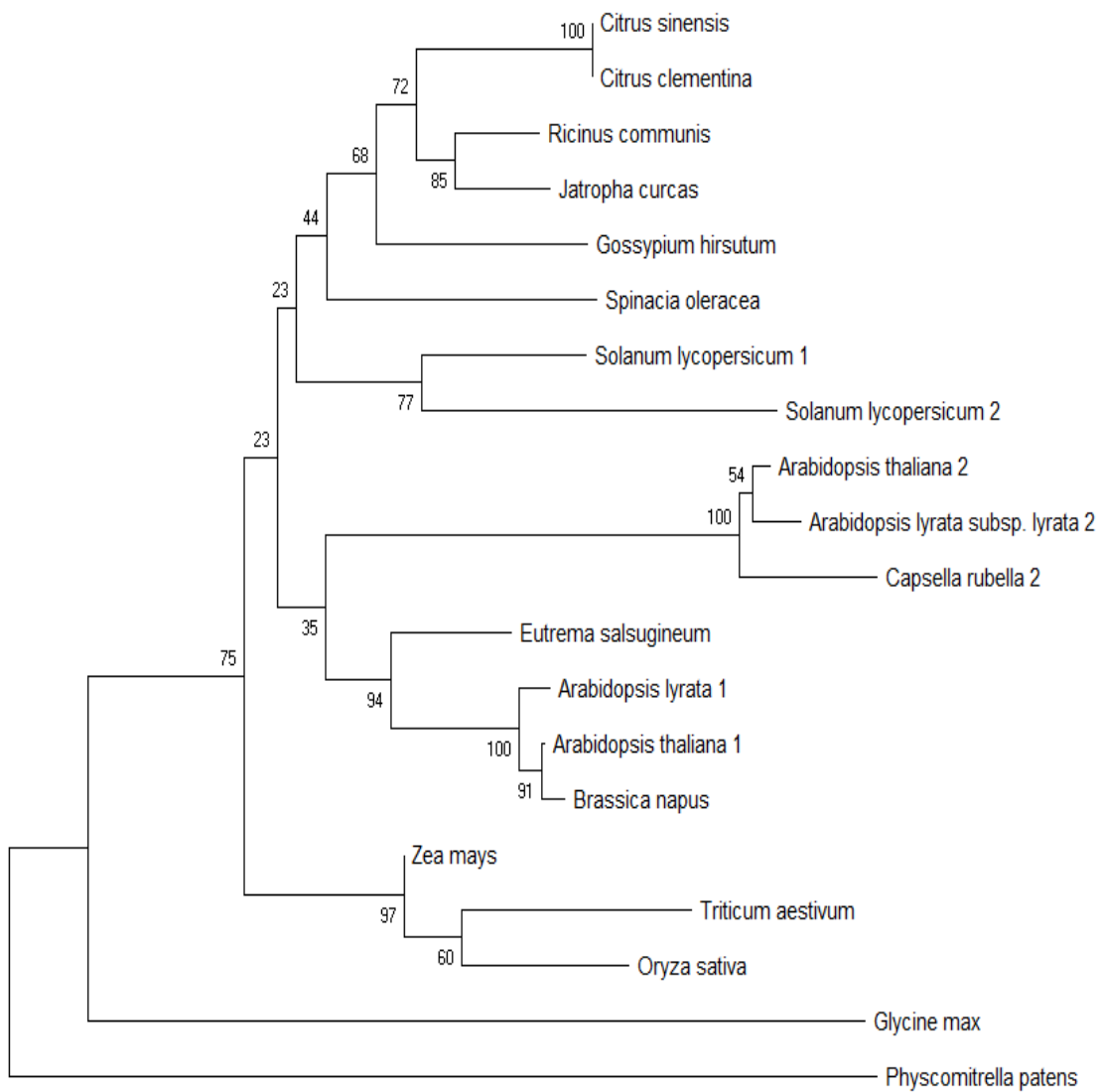


Ilustración 4. Árbol filogenético de las secuencias de arginasas de diferentes especies.

1.2. Identificación del gen ortólogo en *Citrus x aurantifolia*.

En el caso de *C. aurantifolia*, ya que el gen codificante de arginasas no está reportado en las bases de datos, se realizó una búsqueda en la base de datos del NCBI para encontrar genes codificantes de arginasas que fueran potenciales homólogos entre *Citrus sinensis*, y *Citrus clementina*, comprobando por medio de un alineamiento (Ilustración 5) que la secuenciación resultante fuera conservada en el genoma de *C. clementina* y *C. sinensis*.

Download ▾ GenBank Graphics					
Citrus clementina cultivar Clemenules unplaced genomic scaffold, Citrus_clementina_v1.0 scaffold_3					
Sequence ID: NW_006262339.1 Length: 51047765 Number of Matches: 1					
Range 1: 49847256 to 49850431 GenBank Graphics			▼ Next Match ▲ Previous Match		
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
5860 bits(3173)	0.0	3175/3176(99%)	0/3176(0%)	Plus/Minus	
Features: arginase 1, mitochondrial arginase 1, mitochondrial					
Query 372110	AATTGATGTCATCATTATCTCTCACTCCCAAAACATCTTGATTAGCAAAATTACCCTTTA				372169
Sbjct 49850431	AATTGATGTCATCATTATCTCTCACTCCCAAAACATCTTGATTAGCAAAATTACCCTTTA				49850372
Query 372170	GTTGCGCTTGGTCACGGATGCCAGCAACTCTCGAGTGCCTAAATTCTAAGCATCAGCAT				372229
Sbjct 49850371	GTTGCGCTTGGTCACGGATGCCAGCAACTCTCGAGTGCCTAAATTCTAAGCATCAGCAT				49850312
Query 372230	ATTAATACTGGGATCTTGAATCATATGTATAAAATAGTAATCTCTGGCTCCAATCGACG				372289
Sbjct 49850311	ATTAATACTGGGATCTTGAATCATATGTATAAAATAGTAATCTCTGGCTCCAATCGACG				49850252
Query 372290	TCCACCGTAACTGAAAAGAAAAAGGCTGGTCCCTTAAAGTAGCGCCAGCTAAATACACT				372349
Sbjct 49850251	TCCACCGTAACTGAAAAGAAAAAGGCTGGTCCCTTAAAGTAGCGCCAGCTAAATACACT				49850192

Ilustración 5. Alineamiento entre las arginasas de *C. sinensis* y *C. clementina*

También se realizó un alineamiento del gen de arginasa de *C. sinensis* con la de *A. thaliana* y se buscó una región apropiada para diseñar un gRNA, ya que la proteína de *A. thaliana* tiene reportados los sitios con cofactores en la proteína y sitios de unión a sustrato, por lo que se usó como referencia para realizar un alineamiento (Ilustración 6) entre las secuencias de aminoácidos de las dos proteínas, y en el cual el resultado fue que los sitios de interés estaban conservados en la arginasa de *C. sinensis*, de acuerdo a los sitios reportados por Chen *et al.*, 2004, estos sitios se encuentran codificados en el exón 4 y 6 (Ilustración 11). Cabe mencionar que ninguno de los sitios de interés están reportados de forma oficial en la proteína arginasa de *C. sinensis*, por lo que los sitios de unión en la arginasa de naranja fueron predichos con la ayuda del trabajo del autor Chen *et al.*, 2004, en donde reporta los sitios importantes de las enzimas arginasas en diferentes especies, como arroz, tomate, soya, *Arabidopsis*, entre otros organismos que no son vegetales, la predicción fue hecha fundamentalmente en los sitios conservados entre las proteínas arginasa de diferentes especies reportadas, en específico con *A. thaliana*.

Arginase/deacetylase superfamily protein [Arabidopsis thaliana]

Sequence ID: [NP_192626.1](#) Length: 344 Number of Matches: 1

Range 1: 4 to 344 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
585 bits(1507)	0.0	Compositional matrix adjust.	281/341(82%)	309/341(90%)	6/341(1%)
Query 5	IGKRGVHYLQKLKSA-----NIPIAVIEKQNRVIDASLTLIRERAKLKGELVRLGGA				58
Sbjct 4	IG+RGV Y Q+L +A ++P +++E GQNRVIDASLTLIRERAKLKGELVR +GGA				63
Query 59	IGQRGVPYFQRLIAAPFTTLRSLPTSLVETGQNRVIDASLTLIRERAKLKGELVRLGGA				63
Sbjct 64	VASTSLLGVPLGHNSSFLQGPAPFAPPRIREAIWCGSTNSTTEEGKELNDPRVLT DVG DVP				118
Query 119	A+T+LLGVPLGHNSSFL+GPA APP +REAIWCGSTNSTTEEGKEL DPRVL+DVG D+P				118
Sbjct 124	KATTALLGVPLGHNSSFLEGPALAPPHVREAIWCGSTNSTTEEGKELKDPRLSDVGDIP				123
Query 179	VQEIRDCGVDDRLMNVITESVKLVMEEDPLHPLVLGGDHSISFPVIRAVSEKLGGPVDV				178
Sbjct 184	VQEIR+ GVDDRLM V++ESVKLVMEE+PL PLV+GGDHSIS+PV+RAVSEKLGGPVD+				183
Query 239	VQEIREMGVDDRLMKVVSSESVKLVMEEPLRPLVIGGDHSISYPVIRAVSEKLGGPVDI				183
Query 179	LHLDAHFDIYDAFEGNKYSHASSFARIMEGGYARLLQVGIRSIKREGREQKRFVGEQY				238
Sbjct 184	LHLDAHFDIYDFEGNYYSHASSFARIMEGGYARLLQVGIRSI KEGREQKRFVGEQY				243
Query 239	EMRTFSRDRQFLENLKLGEVKGVIYSVDVDCLDPAFAPGVSHIEPGLSFRDVLNLIHN				298
Sbjct 244	EMRTFS+DRQ LENLKLGEVKGVIYS+DVCCLDP FA GVSHIEPGLSFRDVLNLIHN				303
Query 299	EMRTFSKDRQMLENLKLGEVKGVIYSIDVDCLDPGFAHGVSHIEPGLSFRDVLNLIHN				303
Query 299	LQADVVAADVVEFNFPQRDITVDGMTAMVAAKLVRELTAKISK 339				339
Sbjct 304	LQ D+V ADVVE+NPQRDIT D MTAMVAAK VREL AK+SK 344				344

Ilustración 6. Alineamiento de las proteínas arginasa 2 y 1 de *A. thaliana* y *C. sinensis*, respectivamente.

Los recuadros naranjas son los aminoácidos con unión a manganeso y de rojo los sitios de unión a sustrato en la arginasa de *A. thaliana*, que están conservados en *C. sinensis*, el recuadro verde corresponde al exón 4.

Para confirmar que la secuencia existe dentro del genoma de *C. aurantifolia*, se amplificó el exón 4 en el genoma de limón, la región fue amplificada exitosamente y se muestra en la ilustración 7:

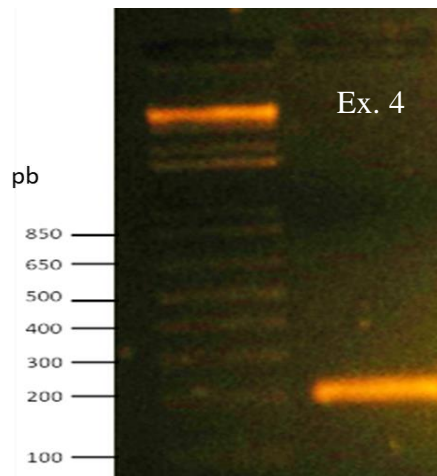


Ilustración 7. Amplificación de la región del exón 4 en muestras de ADN de *C. aurantifolia*.

Después de haber obtenido la amplificación del exón, el producto que se obtuvo de *C. aurantifolia* de PCR fue secuenciado, resultando en el siguiente cromatograma (Ilustración 8)

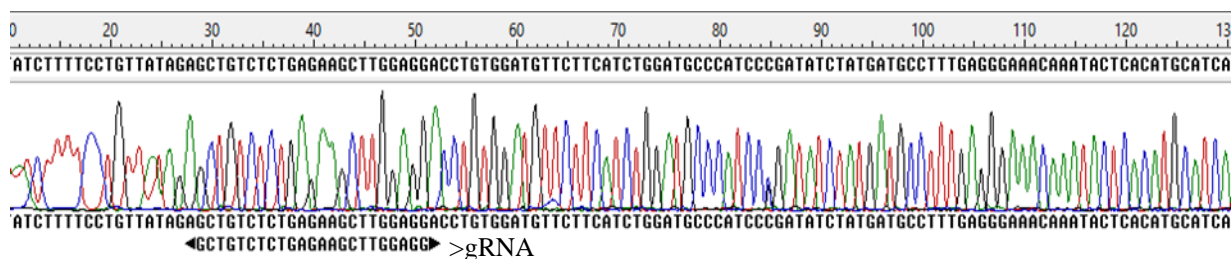


Ilustración 8. Cromatograma y secuenciación del exón 4 de *C. aurantifolia*, con la secuencia gRNA alineada.

La secuencia curada es:

GAGCTGTCTCTGAGAAGCTTGGAGGACCTGTGGATGTTCTTCATCTGGATGCCCATCCCGATATCTATGATGCCTTTGAGGGAAACAATACTCACATGCATCATCTTTGCCCGAATCATGGAAGGTGGTTATGCTAGGCGGTTATTGCAGA. El gRNA se ubica en los nucleótidos azules y el PAM en rojo. También se realizó un BLAST para confirmar que la secuencia esta conservada en los genomas de cítricos, el alineamiento se puede observar en la Ilustración 9:

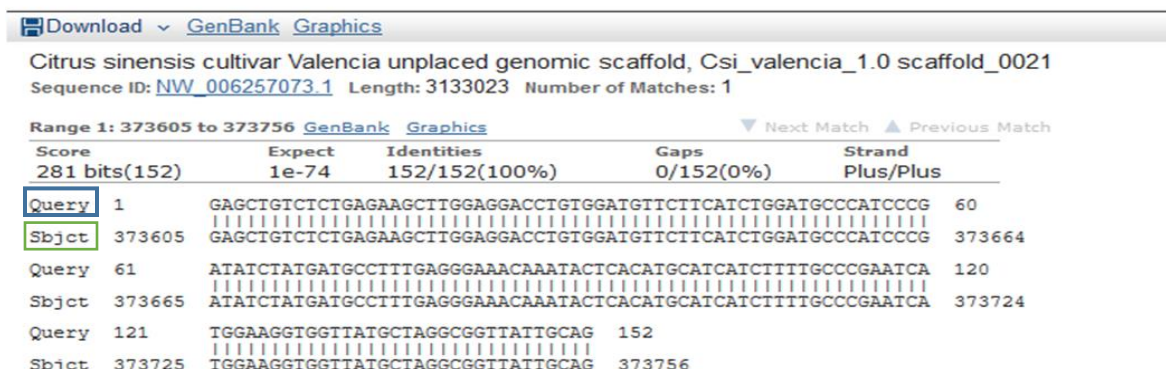
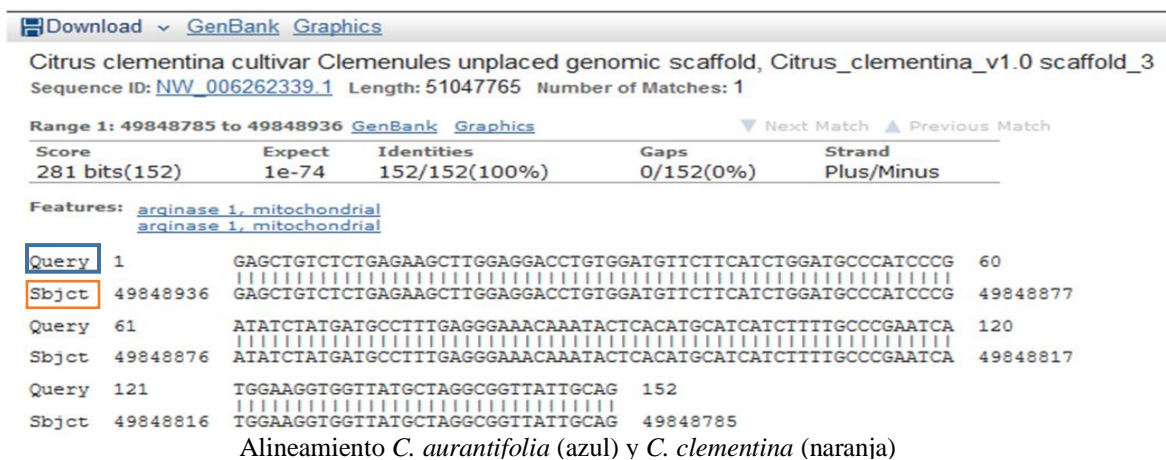


Ilustración 9. Blast realizados a la secuencia amplificada de *C. aurantifolia* en los genomas de *C. clementina* y *C. sinensis*

1.3. Patrón de expresión de la arginasa de *C. aurantifolia*.

Se realizó una RT-qPCR para confirmar si los patrones de expresión de el gen correspondían a un patrón de expresión de arginasas. Para analizar los niveles de expresión del gen de la arginasa en *Citrus x aurantifolia*, se realizó una RT-qPCR en diferentes tejidos de plántulas: semilla, semilla germinada, hoja, hoja cotiledonar, tallo y raíz. Los datos obtenidos se presentan en la Ilustración 10.

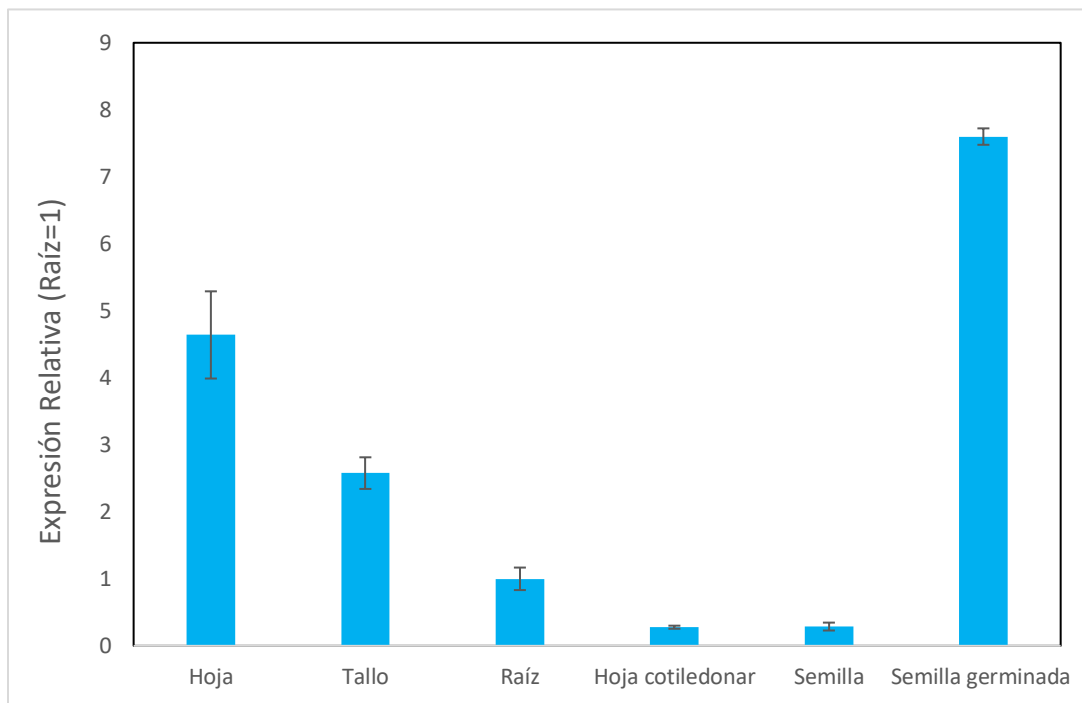


Ilustración 10. RT-qPCR para arginasa en tejidos de plántulas de *C. aurantifolia*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el tejido con mayores niveles de expresión fue la semilla germinada, seguido de hoja, tallo, raíz, hoja cotiledonar y semilla. Respecto los niveles de expresión en el tejido de semilla germinada, esto se debe a que en la etapa temprana de la germinación la planta empieza a incrementar la cantidad de transcritos de arginasas, para metabolizar la arginina almacenada, como en cualquier otra especie, en las semillas se almacena nitrógeno en forma de arginina, entonces la actividad de arginasas se inicia con la liberación de nitrógeno a partir de la arginina, lo cual es acompañado por un incremento en los niveles de arginina y urea (Zonia *et al.*, 1995), para que la planta pueda degradar la arginina almacenada en las semillas y movilizar el nitrógeno, grandes cantidades de arginina necesitan ser transportadas a la mitocondria por acarreadores BAC durante el desarrollo de la plántula, haciéndolo accesible para la arginasa localizada en el organelo (Flores *et al.*, 2008). En cuanto a los órganos de hojas, raíces y tallos de la planta, es de esperarse que en tejidos fotosintéticos tengan una mayor cantidad de transcritos que en las raíces, como se puede notar en la gráfica, las hojas son las que principalmente tiene el mayor número de transcritos entre los órganos de la planta, seguido del tallo y después la raíz. Ya que la hoja es el principal órgano fotosintético de las plantas es de esperarse que haya una mayor

presencia de transcritos, ya que en el cloroplasto es donde ocurre la biosíntesis de la arginina y también se cataboliza en las mitocondrias, en cuanto al tallo, su principal función es dar sostén a la planta y como un órgano que transporta agua, nutrientes, entre otros compuestos, además de que también tiene función fotosintética, pero su función no es principalmente llevar a cabo procesos metabólicos, por lo que no hay tanto metabolismo de arginina como en la hoja, en el caso de raíz es de esperarse que haya menos transcritos de arginasas respecto a otros órganos fotosintéticos, ya que las raíces en general no tiene esta función en las plantas, por lo que no hay biosíntesis de arginina en las raíces, sin embargo, si existe un transporte de arginina en la planta y en la raíces es donde se encuentra la arginina almacenada para la removilización del nitrógeno en la planta, por lo que de esta manera las células de la raíz pueden degradar la arginina en sus mitocondrias, para llevar a cabo los procesos metabólicos que lo requieran (Witte, 2010; Winter *et al.*, 2015). En los cotiledones, la arginina representa aproximadamente el 40% del nitrógeno total (Slocum, 2005), por lo que se espera que ese tejido tenga bastante expresión de transcritos, ya que en el desarrollo de la planta necesita de nitrógeno para desarrollarse, sin embargo en el caso de las hojas cotiledonares, dado que el nivel de expresión es muy bajo para transcritos de arginasa, quiere decir que en el tejido hay poco catabolismo de arginina, esto se debe a que el tejido en la etapa actual del desarrollo de la planta, es un tejido más vestigial que funcional ya que cumplió su función de almacenamiento de la planta y su función fotosintética. En el caso de la semilla es de esperarse obtener niveles tan bajos de expresión, por lo que es un organismo en estado latente y la mayor parte de su tejido es destinado para el almacenamiento de nutrientes.

Adicionalmente comparando con el patrón de expresión de *A. thaliana*, la expresión de *argah1* es mayor en raíces, hojas y silicuas, aunque el nivel de expresión relativa es menor a uno, tomando como referencia la raíz, ya que la expresión de *argah2* fue muy alta en las silicuas y alta en hojas, mientras que es muy baja en la raíz, comprobando que el gen *argah2* tiene la expresión dominante en *A. thaliana* (Shen *et al.*, 2018). Por lo tanto, se considera que el patrón de expresión de *argah2* es semejante al resultante para *C. aurantifolia*, por lo que la arginasa de *C. aurantifolia* sigue un patrón de expresión normal de la arginasa 2 de *A. thaliana*. Otro punto importante que resaltar, es la expresión de arginasas en tejidos maduros, ya que en este caso se utilizaron plántulas. Un estudio en la expresión de arginasas de Tomate, revela que la arginasa 1 y 2 del tomate muestran una alta expresión en tejidos florales maduros, como botones florales, flores abiertas y frutos inmaduros, precisamente más en botones florales que aún no abrían (Chen *et al.*, 2004), además de los niveles de expresión obtenidos sería más complementarios los resultados al analizar plantas adultas de limón, además de verificar la expresión en tejidos ya estudiados como son las hojas y raíces, también se podrían analizar el nivel de transcritos que tienen las arginasas en tejidos en desarrollo así como también tejidos reproductivos que no se pueden analizar en las etapas tempranas de estas plantas, de acuerdo a lo reportado en tomate, se podría esperar que también en tejidos florales y en frutos inmaduros se encuentre una alta expresión de arginasas, debido a que estos tejidos se encuentran en desarrollo y su actividad metabólica es muy activa.

2. Diseño y clonación de gRNAs en vectores plasmídicos

2.1. Diseño de gRNAs para *C. aurantifolia*

Después de identificar el gen en *C. aurantifolia* se realizó el siguiente esquema (Ilustración 11) de la estructura del gen de la arginasa indicando los sitios de interés hipotéticos.

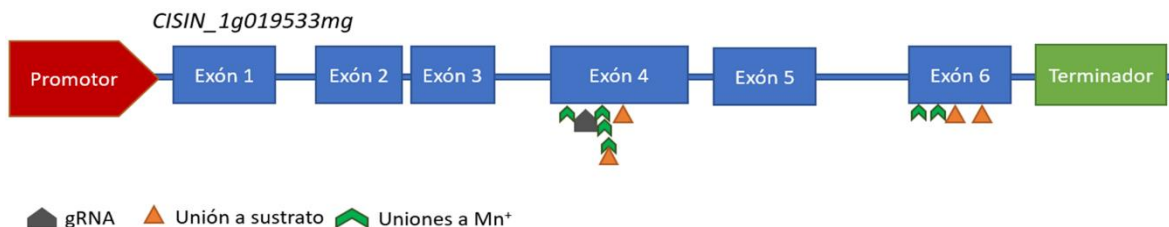


Ilustración 11. Estructura del gen codificante de arginasa en *C. sinensis*, el gRNA se diseñó casi al principio del exón 4

El BLAST en cítricos indicó que la secuencia de *C. aurantifolia*, tiene un 100% de identidad con el genoma de *C. clementina* y *C. sinensis*, por lo cual podríamos inferir que se trata del mismo gen en limón, con el resultado de la secuenciación y el BLAST se dio paso a realizar el diseño del gRNA dentro de la región del exón 4, la secuencia seleccionada para ser el gRNA fue la siguiente: GCTGTCTCTGAGAAGCTTGGAGG (PAM). Una mutación en el exón 4 puede inactivar los sitios de unión a manganeso o perderlos si ocurre un paro prematuro en la traducción de la secuencia, en el caso de que ocurra una sustitución, lograr disminuir la actividad de la enzima y en el caso de una delección; la enzima puede perder su actividad, generando proteínas truncas que no tenga la mayoría de sitios de unión a sustrato, sin embargo en este caso la proteína aún pueda tener actividad, pero se espera que esta sea reducida sin la necesidad de realizar un knockout completo del gen y manteniendo la ruta metabólica de la arginasa activa, de esta forma también se espera que aumenten las concentraciones de óxido nítrico promoviendo el crecimiento radicular.

De acuerdo con el alineamiento entre las proteínas y los sitios activos reportados por Chen en 2004, los sitios importantes del gen *argah2* están conservados en la secuencia de aminoácidos de la arginasa de *C. sinensis*, además de que el BLAST mostró un 82% de identidad entre ambas proteínas, por lo que es probable que los mismos sitios estén activos en las arginasas de cítricos.

También el alineamiento, dio información suficiente para saber que la secuencia nucleotídica del gRNA también está conservada en el grupo de los cítricos, por lo menos para *C. sinensis*, y *C. clementina*, ya que no se encuentran reportadas otras especies de cítricos para este gen, el valor de identidad nos confirma que la secuencia que se está estudiando está bien conservada en mayor parte de las tres especies y es muy probable que la secuencia del exón 4 también lo esté para otras especies de cítricos, por lo tanto si la región está conservada, el diseño del gRNA para editar el gen codificante de arginasa en *C. aurantifolia*, también puede editar el mismo gen en la misma región de otras especies de cítricos que estén emparentadas. Adicionalmente, el gRNA diseñado, tiene un sitio de pérdida de restricción de HindIII, esto es una ventaja práctica, ya que permite un análisis más sólido en cuanto a identificar que haya

ocurrido una posible edición en el genoma de planta. El corte ocurre en la secuencia AAGCTT, y en el caso de una posible edición, se realiza un ensayo de pérdida de restricción en esta región y en consecuencia se observaría una banda en el gel en vez de dos, que esta última nos indica que HindIII cortó el segmento de ADN.

Otra observación interesante que mencionar, es que el diseño del gRNA o en su defecto la secuencia está presente en una gran cantidad de especies de plantas, dado el potencial del gRNA diseñado, la misma construcción podría ser útil para editar con el mismo gRNA diferentes especies de plantas, sin tener que recurrir a un estudio previo para el diseño de uno, lo único que se necesitaría saber es identificar los genes y los sitios en el cual está presente la secuencia en cada una de las especies, a esta secuencia se le realizó un BLAST para contemplar el potencial de edición que puede tener la secuencia. Algunas de las especies en donde se encuentra conservado el gRNA se muestran en la siguiente lista (Tabla XIV):

Nombre común	Nombre Científico	Numero de accesoión (NCBI)
Guandú	<i>Cajanus cajan</i>	NC_033804.1
Clementina	<i>Citrus clementina</i>	NW_006262339.1
Naranja	<i>Citrus sinensis</i>	NW_006257073.1
Durián	<i>Durio zibethinus</i>	NW_019168270.1
Soja	<i>Glycine max</i>	NC_038253.1
Cacao	<i>Herrania umbratica</i>	NW_018397262.1
Altramuz azul	<i>Lupinus angustifolius</i>	NC_032009.1
Manzano	<i>Malus domestica</i>	XM_008374493.3
Yuca	<i>Manihot esculenta</i>	NC_035161.1
Carretón	<i>Medicago truncatula</i>	NC_016410.2
Melón amargo	<i>Momordica charantia</i>	NW_019104632.1
Álamo negro	<i>Populus trichocarpa</i>	NC_037286.1
Melocotonero	<i>Prunus persica</i>	NC_034010.1
Rosa china	<i>Rosa chinensis</i>	NC_032009.1
Árbol del Cacao	<i>Theobroma cacao</i>	NC_030857.1
Frijol mungo	<i>Vigna radiata</i>	NC_028359.1

Tabla XIV. Lista de especies en donde se encuentra conservado el gRNA diseñado para *C. aurantifolia*.

	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Cajanus cajan	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	A	G	G
Citrus clementina	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	A	G	G
Citrus sinensis	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	A	G	G
Durio zibethinus	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	T	G	G
Glycine max	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	A	G	G
Herrania umbratica	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	T	G	G
Lupinus angustifolius	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	A	G	G
Malus domestica	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	G	G	G
Manihot esculenta	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	C	G	G
Medicago truncatula	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	A	G	G
Momordica charantia	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	G	G	G
Populus trichocarpa	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	G	G	G
Prunus persica	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	G	G	G
Rosa chinensis	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	G	G	G
Theobroma cacao	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	T	G	G
Vigna radiata	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	A	G	G
gRNA	G	C	T	G	T	C	T	C	T	G	A	A	G	C	T	T	G	G	A	G	G

Ilustración 12. Alineamiento del gRNA con otros organismos vegetales, el recuadro rojo indica el PAM en la secuencia.

2.2. Diseño de gRNAs para *A. thaliana*

Para *A. thaliana*, se consideró lo reportado por Flores *et al.*, (2008), en donde el gen *argah2* tiene el mayor nivel de expresión en la planta, por lo que se decidió diseñar los gRNAs en este gen. Para el diseño de los gRNA se tomaron en cuenta diferentes características que presentaba el gen y se decidió analizar las secuencias proteicas reportadas por Chen *et al.*, 2004, e información estructural obtenida en la base de datos de Uniprot. Dentro de la proteína se tomaron en cuenta sitios de unión a sustrato, que correspondían a los codones dentro del gen *argah2*, por lo que el exón 2 y el exón 5 fueron elegidos a ser editados (Ilustración 13), el exón 2 por ser un exón temprano en la transcripción, una edición en esta región causaría un corrimiento en el marco de lectura del gen y se lograría que la proteína fuera disfuncional. el exón 5 se decidió utilizarlo, ya que una edición en esta parte del gen podría inactivar o truncar la proteína provocando que se pierdan los sitios de unión a sustrato y manganeso, por lo que una edición en este sitio podría provocar una disminución en la actividad de la enzima.

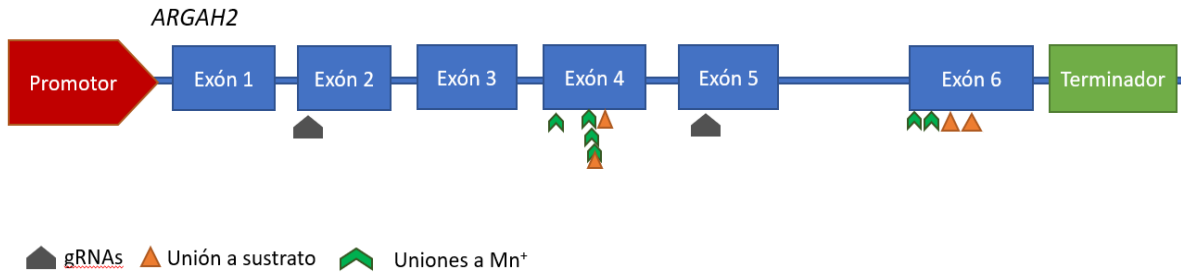


Ilustración 13. Estructura del gen ARGAH2. Los gRNA fueron diseñados, en el exón 2 y 5, los sitios de unión a manganeso se encuentran en el exón 4 y 6, los sitios de unión a sustrato se encuentran en el exón 4 y 6

Teniendo en cuenta estas características, los gRNAs fueron diseñados con el software en línea Deskgen (<https://www.deskgen.com/landing/>). Los gRNAs elegidos fueron los siguientes: Exón 2: GAGTTAGTGCGACTCATAGGAGG y para el Exón 5: GATCCATAAACAAAGAAGGACGG (Ilustración 14 y 15).

Sequence	PAM	Exon	Activity	Off-target
<input checked="" type="checkbox"/> GAGTTAGTGCGACTCATAGG	AGG	2	60	100

Guide Details

Cut site	chr4 [+5,648,412 : -5,648,412]
GC %	50
Activity	60
Off-target	100

OFF-TARGET ANALYSIS:

Mismatches	0	1	2	3	Total
Coding	0	0	0	1	1
Non-Coding	0	0	0	0	0

OFF-TARGET HITS:

Sequence	PAM	Similarity	Mism.	Gene	Locus
GAGTTAGTGCGCTCTTTTAGG	TGG	0	12,15,16	Yes	chr4@ 5703732-5703755

Ilustración 14. Diseño de gRNAs en Deskgen: gRNA del exón 2 A. thaliana

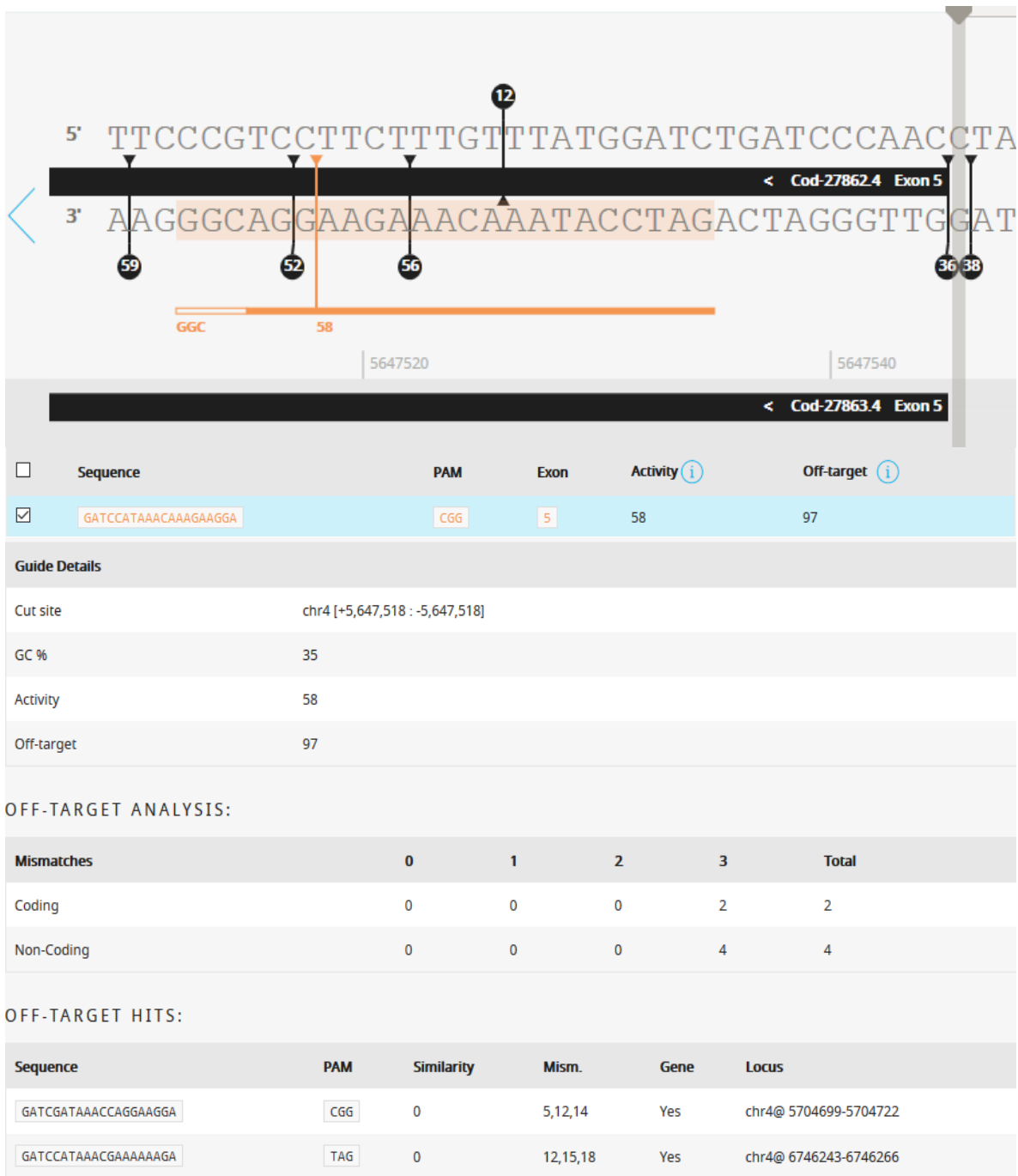


Ilustración 15. Diseño de gRNAs en Deskgen: gRNA del exón 5 *A. thaliana*.

2.3. Construcciones de los plásmidos recombinantes pBUN4U6SM-ATARGAH2 E2, E5 y CsARGAH

Los gRNAs diseñados para editar los exones E2 E5 y E4 en cítricos, fueron ligados en el vector pBUN4U6SM (Ilustración 16) e insertados en una cepa bacteriana de *E. coli*, a estas cepas se les aplicó una PCR (Ilustración 18) para amplificar el promotor *U6* y el sgRNA; usando de oligonucleótidos U6p-F y la hebra reversa del sgRNA, también se les realizó una digestión con HindIII, además de una posterior secuenciación de las cepas transformadas (Ilustración 17), con esto se comprobó que los insertos estaban íntegros en las cepas bacterianas usadas, así como también los gRNAs. Después de obtener las construcciones en *E. coli* estas se guardaron en un stock de glicerol y se procedió a cultivar varias colonias de la bacteria y extraer su ADN, seguido este fue transformado en cepas de AGL1, a las cuales también se les realizó una PCR para comprobar que el inserto estuviera íntegro en las cepas de AGL1. En el caso de la construcción para cítricos, solo se necesitó realizar una digestión del ADN con HindIII, ya que el gRNA tiene un sitio de corte, por lo que, si se observaba doble banda, quería decir que el plásmido estaba íntegro dentro de la cepa de AGL1.

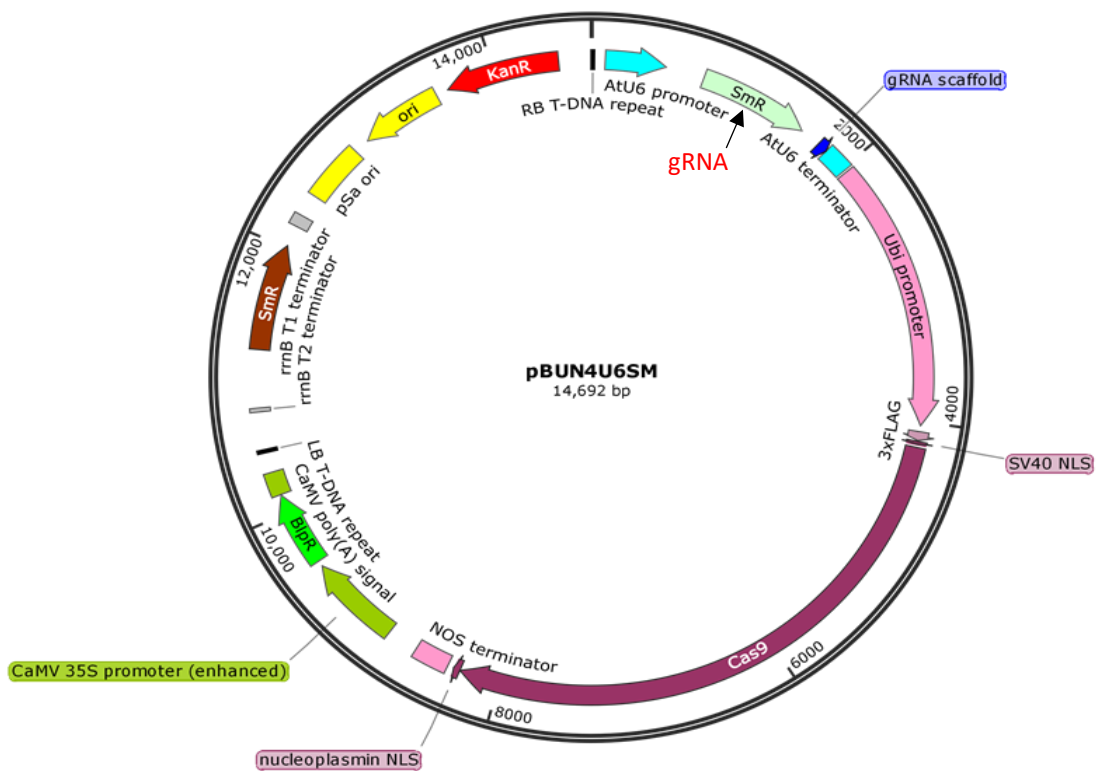


Ilustración 16. Mapa del vector pBUN4U6SM

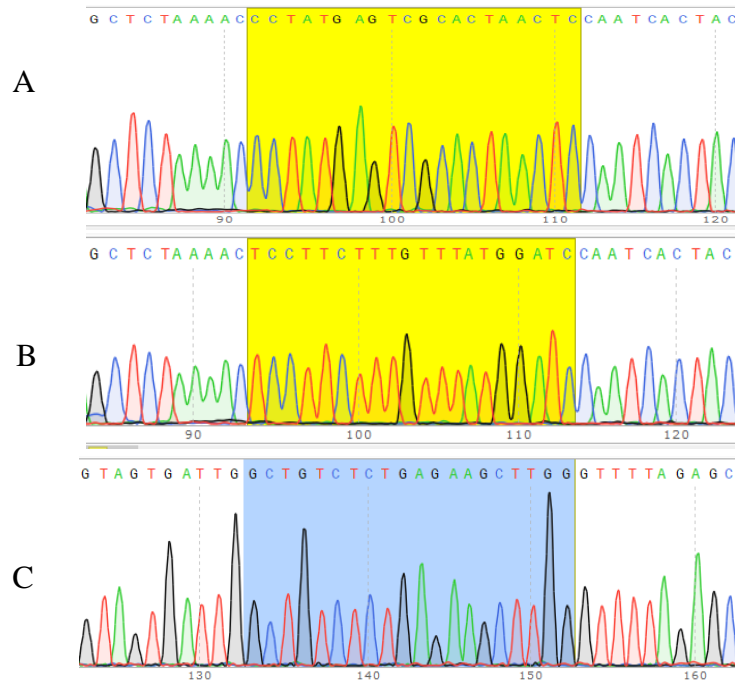


Ilustración 17. Secuenciaciones de las cepas usadas, la secuencia sombreada corresponde al gRNA; **A**: secuenciación de la construcción del exón 2 en *A. thaliana*, **B**: secuenciación de la construcción del exón 5 en *A. thaliana*, **C**: secuenciación del exón 4 en *C. aurantifolia*.

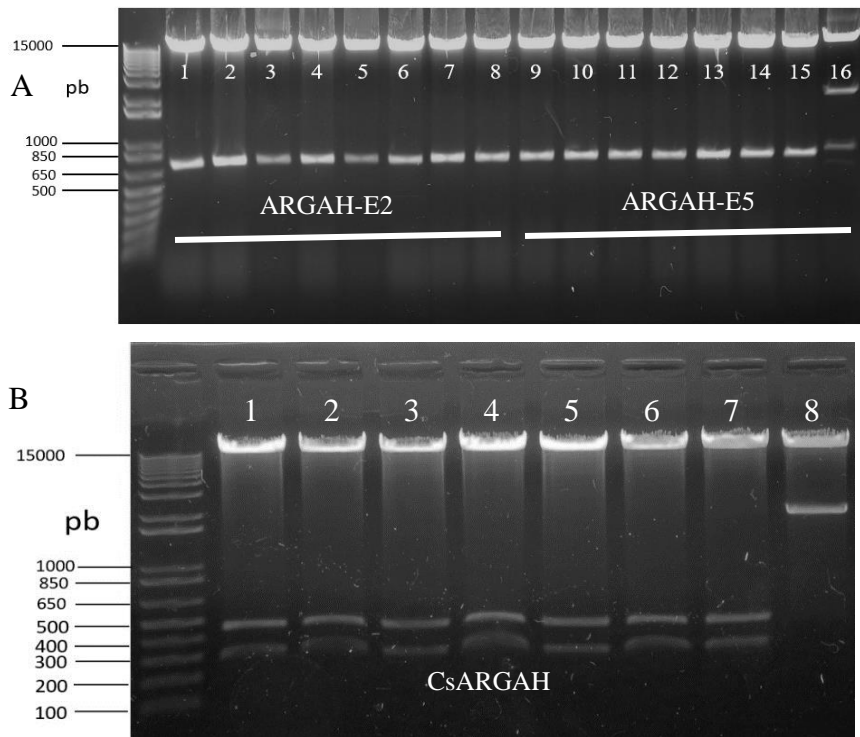


Ilustración 18. Digestiones con HindIII **A**: digestión con HindIII al ADN de las colonias transformadas de *E. coli*. para las construcciones ARGAH2-E2 (1-8) y E5 (8-16), **B**: digestión con HindIII, a las 8 colonias transformadas de *E. coli* para la construcción de CsARGAH, se puede notar la doble banda producto de la digestión con HindIII. 50

3. Obtención de transformantes

3.1. Transformantes para la construcción AT ARGAH2 E2

Para la generación de mutantes del exón 2 del gen *argah2* de *A. thaliana*; después de realizar la transformación con la respectiva construcción del vector de edición de genes en una cepa de AGL1 y de la respectiva selección por glufosinato de amonio por un mes, se obtuvo una sola planta que sobrevivió a la selección. Para el caso de la construcción AT ARGAH2 E2, se obtuvo únicamente una sola línea transformante, que fue confirmada por medio de una PCR utilizando los oligonucleótidos para Cas9 (Ilustración 17).

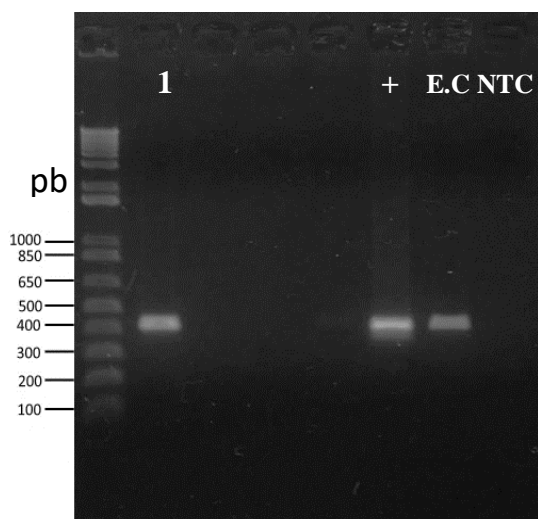


Ilustración 19. PCR de la línea 1 de la construcción AT ARGAH2 E2, para confirmar que la planta fuera una positiva transformante.

Sin embargo, la planta transformada dio muy pocas semillas para continuar trabajando con la línea. Desafortunadamente no se obtuvieron más líneas para esta construcción, por lo que el esfuerzo del estudio se enfocó al desarrollo de líneas para la construcción AT ARGAH2 E5, para editar el exón 5 del gen.

3.2. Transformantes para la construcción AT ARGAH2 E5

Para la generación de mutantes del exón 5 del gen *argah2* de *A. thaliana*, se realizó la transformación con la respectiva construcción del vector de edición de genes en una cepa de AGL1 y también se realizó la selección con glufosinato de amonio por un mes, se obtuvieron tres plantas que sobrevivieron a la selección, a las cuales se les realizó una PCR para confirmar que fueran transformadas positivas, amplificando Cas9 (Ilustración 18).

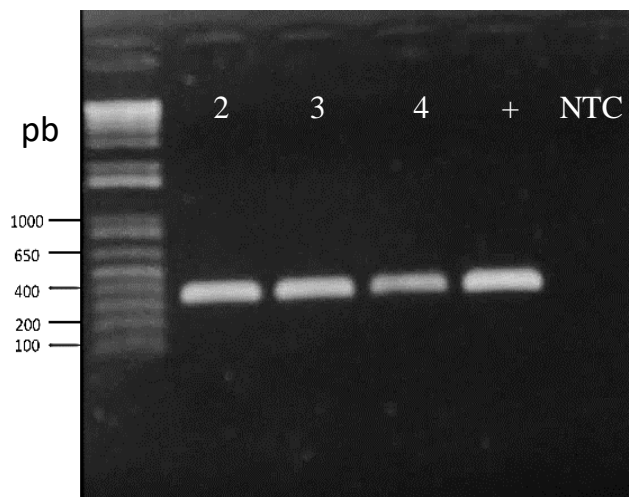


Ilustración 20. PCR de las líneas de plantas transformadas positivas para la construcción AT ARGAH2 E5, se obtuvieron 3 líneas positivas, 2,3,4 y un control positivo.

3.3. Transformantes de *Citrus x aurantifolia*.

Se transformaron 4 lotes, de explantes de hipocótilos de limón, estos explantes fueron puestos en un medio selectivo con 20mg/L de herbicida glufosinato de amonio, para seleccionar los explantes transformados. Contabilizando la cantidad de hipocótilos transformados y los regenerantes se realizó la tabla XV, para estimar el porcentaje de eficiencia de transformación. A pesar de la gran cantidad de hipocótilos utilizados, solamente se consiguieron 4 explantes de *C. aurantifolia* efectivamente transformados, por lo que la eficiencia de transformación resultó ser muy baja, correspondiendo a tan solo un 0.7%, Dutt y Grosser, 2009, en su trabajo en donde desarrollan un protocolo para transformar cítricos, explican que *Citrus x aurantifolia* es una especie que esta reportada como recalcitrante a la transformación mediada por *Agrobacterium*, en su trabajo obtuvieron que la eficiencia de transformación en limón mexicano fue de 8%, usando epicótilos de limón mexicano, además la baja eficiencia de transformación también se ve influida por el uso de glufosinato para seleccionar explantes transformados, por lo que con estos dos factores pudieron ser la causa de obtener una baja eficiencia de transformación. Otros valores que se reportan con el uso de glufosinato de amonio para la selección de explantes son de un 16.9% de eficiencia de transformación en explantes de limón (Ghaderi *et al.*, 2018) usando 1mg/L de herbicida Basta, también hay otro reporte de un 30% de la eficiencia de transformación en callos embriogénicos, usando 50 mg/L de herbicida Basta (Li *et al.*, 2003). Por lo reportado en la literatura, la eficiencia de transformación varía mucho, en cuanto al uso de glufosinato de amonio como agente de selección, sin embargo, entre los trabajos mencionados, difieren los protocolos de transformación. En el trabajo de Ghaderi, se usan reguladores de crecimiento como kinetina e IAA, para la regeneración de los explantes transformados, Li transforma callo de *C. sinensis*, con diferentes temperaturas de incubación para mejorar la eficiencia de transformación, en el caso de este trabajo se utilizaron BAP, NAA y GA, como reguladores de crecimiento en los medios MS para regenerar los explantes, por lo que el proceso de transformación y los componentes usados en esta pueden influenciar en la eficiencia de

transformación de los explantes, además del uso de diferentes concentraciones de glufosinato de amonio para la selección de estos, puede influir bastante en la supervivencia de los explantes.

Para confirmar que los explantes están efectivamente transformados y que al igual que las transformantes de *A. thaliana*, se realizó la misma PCR para amplificar Cas9 en los explantes de *C. aurantifolia*. (Ilustración 21).



Ilustración 21. PCR de Cas9 de los explantes transformados de *C. aurantifolia*, 1-3 explantes negativos para Cas9, 4-7 explantes positivos para Cas9, control negativo y positivo.

Número de explantes	Explantes regenerantes	Porcentaje de regeneración	Eficiencia de transformación (%)
550	138	25	0.72

Tabla XV. resumen del número de explantes usados y cálculo de la eficiencia de transformación.

Para confirmar que en efecto los explantes están transformados, se necesita estar seguro de que la amplificación no haya sido del vector insertado en *A. tumefaciens*, ya que existen casos donde los medios usados para el crecimiento de los explantes puedan estar contaminados por la bacteria (Yang *et al.*, 2013) y es posible que se haya extraído ADN plasmídico bacteriano junto con los explantes, en ese caso puede ocurrir que lo que amplificara Cas9 es el genoma de la cepa usada para transformar los explantes y pueden resultar en falsos positivos. Para verificar que los explantes analizados estén transformados, se realizó otra PCR para amplificar una región del genoma de cepas de AGL (Ilustración 22), en concreto el gen *virD2*, por lo que en esta prueba los explantes negativos no estarían contaminados con genes de la cepa de AGL. los genes *vir* son necesarios para el procesamiento del T-ADN y la inserción del plásmido Ti en el genoma de la planta infectada, el operón *virD* codifica una endonucleasa de sitio específico que se une en la secuencia borde del T-ADN flanqueándolo (Haas *et al.*, 1995; Mysore *et al.*, 1998).

Con esta PCR se pueden comparar las muestras, de acuerdo con el gel resultante, y al parecer los explantes 4, 5, 6 y 7 están transformados, ya que, comparando las bandas amplificadas de cada línea, los primeros 3 explantes en la PCR para Cas9 no amplificaron y aparentemente

tampoco en la PCR de *virD2*, a excepción del 2 que aparentemente hay una banda, y si se comparan las bandas amplificadas de los explantes 4-7, éstas son más notorias en la amplificación del gen de Cas9 y en contraste con la PCR de *virD2* no parecen haber amplificado genes de la bacteria, por lo que es probable que no estén contaminados y que éstos estén transformados, por lo que se consiguieron transformar 4 explantes de *C. aurantifolia*.



Ilustración 22. PCR de los explantes transformados amplificando *virD2*, los cuales resultaron ser negativos.

4. Obtención y caracterización de las líneas editadas

4.1. Obtención de plantas editadas

Ya que en la generación F1 no se obtuvieron plantas editadas, para obtener plantas editadas y aumentar la eficiencia de edición de Cas9, se decidió por implementar un tratamiento con calor, propuesto por LeBlanc y colaboradores en 2018, a las plantas transformadas de la construcción AT ARGAH2 E5, para aumentar la eficiencia de edición de la enzima Cas9. De acuerdo con el protocolo se programó un itinerario para establecer las horas de calor y recuperación del estrés. Este programa consta de un ciclo de estrés seguido por uno de recuperación. Las plantas transformadas fueron puestas en una incubadora a 37 °C, por 30 horas, seguido por 42 horas de crecimiento vegetativo. En total se cultivaron 132 semillas de AT ARGAH2 E5 y 6 controles silvestres, en medio MS.

El objetivo de poner las plantas bajo este estrés es para darle a la enzima Cas9 un margen de temperatura óptima, que permita la actividad de la enzima y así editar el genoma de la planta, al estar las plantas en un crecimiento vegetativo, todas las células de la planta o por lo menos las que en su mayoría tengan el genoma editado, evitando tener plantas quimeras, con ediciones parciales en el ADN de las células. Al término del tratamiento con calor, las plantas mostraban poco crecimiento, respecto a la caja con los controles silvestres, todas las plantas estaban casi muertas, sin embargo, la mayoría de las transformantes estaban vivas, para los

posteriores análisis en estas plantas solo se tomaron 5 plantas, se seleccionaron aquellas que crecieron bien a pesar del estrés causado por el calor.

Después de realizar el tratamiento de calor, se realizó un análisis de expresión de la proteína Cas9 con un Western Blot, usando el anticuerpo: Anti-3XFLAG M2 Peroxidasa Monoclonal, que reconoce el epítipo 3xFLAG que esta fusionado a la enzima. Para esto se extrajeron 6 muestras de proteína, de las líneas obtenidas del tratamiento de calor, a partir de ahora denominadas como 1C, 2C y 4C, 2 plantas crecidas en incubadora sin haberse sometido a tratamiento de calor y un control silvestre (Ilustración 23).

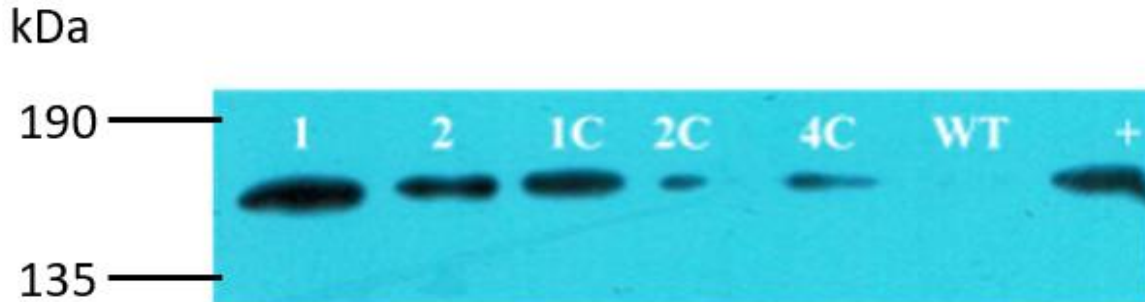


Ilustración 23. Western Blot, de izquierda a derecha: 1-2 muestras tomadas de plantas crecidas en incubadora, 1C, 2C y 4C son las líneas obtenidas del tratamiento de calor, control wt, +; control positivo.

Además del Western Blot, se aplicó una prueba con endonucleasa T7, para identificar las plantas que posiblemente estuvieran editadas. El ensayo se aplicó a las 5 plantas obtenidas del estrés por calor (Ilustración 24).

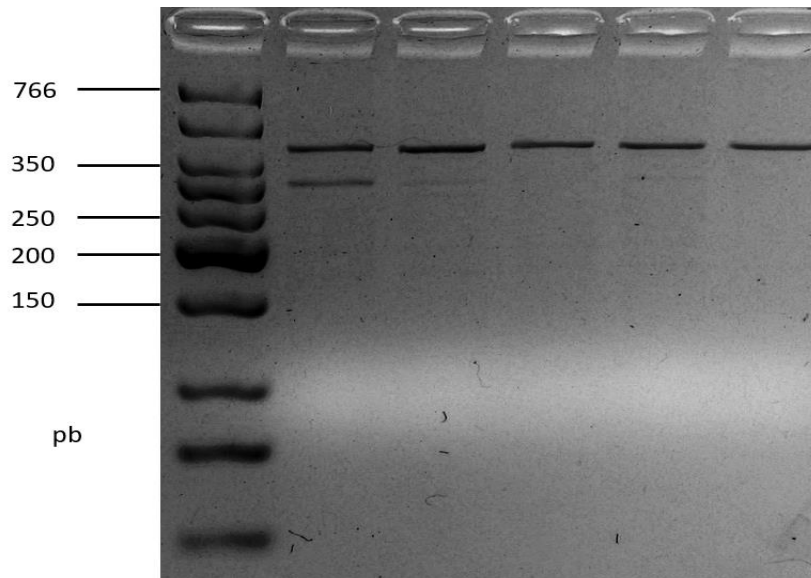


Ilustración 24. Ensayo con endonucleasa T7 de 5 plantas transformadas obtenidas del estrés de calor, de acuerdo con el ensayo, la planta 1, 2 y 4 muestran una banda de aproximadamente 300.

El ensayo mostró que las plantas 1, 2 y 4, presentaban una banda de aproximadamente 300 pb, las plantas 3 y 5 no mostraron esta segunda banda, por lo cual no tienen mismatches en su genoma, y posiblemente no estén editadas. Con estos análisis se puede confirmar que efectivamente las líneas transformadas que fueron obtenidas por medio del tratamiento de calor están expresando Cas9 y también que están potencialmente editadas. Para confirmar que ocurrió una edición posteriormente las líneas positivas al ensayo con endonucleasa fueron secuenciadas. Para esto se realizó una PCR de la región en donde ocurre la edición, en el exón 5 de *A. thaliana*, el fragmento amplificado fue clonado en células de *E. coli*, para posteriormente realizar un cultivo de estas células y el ADN extraído fue secuenciado.

4.2. Caracterización de las líneas editadas

Para analizar las secuencias se utilizó GeneStudio, las secuencias de las líneas obtenidas por el tratamiento de calor 1C, 2C y 4C fueron analizadas en este software (Ilustración 23).

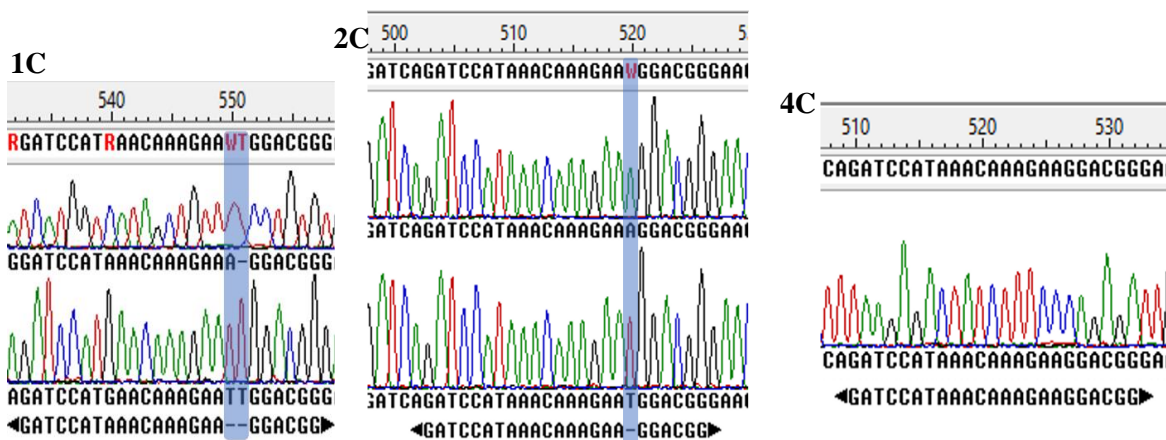


Ilustración 25. Secuenciación de las líneas editadas 1C, 2C y 4C, de izquierda a derecha respectivamente, la edición se muestra con una franja azul y la secuencia del gRNA se muestra entre flechas, las ediciones se encuentran en la misma planta.

En el caso de la línea 2C, se consiguieron dos ediciones sencillas en la misma planta, una inserción de una base, adenina y timina, en el caso de la línea 1C ocurrió una doble inserción de timina y una inserción de adenina en la misma planta, la edición ocurrió a tres pares de bases antes del PAM, sitio en donde suele cortar Cas9, por lo que se confirma que estas líneas han sido editadas. Sin embargo, en cuanto a la línea 4C, no se encontró algún tipo de mutación en las secuencias analizadas, por lo que es probable que la planta 4C hubiera sido solo un falso positivo al ensayo de endonucleasa T7, esto pudo ser causado por diferentes factores, una posible causa podría haber sido un error en el funcionamiento de la enzima *Taq* polimerasa, McInerney *et al.*, 2014, explica que típicamente en el caso de un ensayo de PCR las ADM polimerasas tienen un rango de 10^{-6} de que provoque algún error mutacional o inserte una base incorrecta, en el caso de la enzima que se utilizó en este proyecto para ensayos de PCR fue la enzima *Taq* polimerasa que se reporta que tiene un rango de error de $1-20 \times 10^{-5}$, además de que es una enzima que no tiene una actividad exonucleasa de $3' \rightarrow 5'$, por lo que es incapaz de corregir nucleótidos mal apareados, adicionalmente en su estudio, al calcular el margen de error de la enzima, obtiene que su rango de error es de $4.3 \times 10^{-5} \pm$

1.8 mutaciones/bp por templado de duplicación. Por lo que existe la posibilidad que la polimerasa haya dejado algún error al momento de la duplicación del ADN, por lo que pudo haber causado que la enzima T7 cortara esos mismatches y de acuerdo con la secuenciación estas mutaciones pudieron ocurrir en un sitio distante del gRNA, por lo que la enzima pudo cortar en otra sección del ADN, que no era la de interés.

Durante la edición de las plantas, si un evento de mutagénesis ocurre temprano en la regeneración de las plantas, específicamente, antes de que la primera célula embriogénica se divida, una planta diploide puede ser; heterocigota, esto ocurre si en el locus en donde ocurre la edición solo una de las dos hermanas cromátidas fue mutada, otro caso puede ser una planta homocigota, si ambos alelos fueron mutados y la rotura fuera reparada con la misma mutación, un tercer caso sería que la planta resultara ser bialélica, que es cuando los dos alelos son mutados, pero la reparación resulte en diferentes alelos y por su puesto en muchos casos puede ocurrir que tarde en el desarrollo de las plantas, independientemente en diversos tejidos resultara una planta quimérica que consiste en un individuo con células que tienen diferentes genotipos, en lo cual resulta en una mezcla silvestre, heterocigota, homocigota y bialélica (Belhaj *et al.*, 2015). Para poder obtener plantas libres de transgenes que sean homocigotas editadas, pueden ser seleccionadas después de la segregación de las plantas en la siguiente generación, las plantas editadas pueden ser seleccionar por medio de una PCR y secuenciación de los clones y seleccionando de forma negativa a las plantas libres de transgenes que tengan solamente la modificación deseada (Khatodia *et al.*, 2016). Para esto se tomaron muestras de ADN de la generación F3 de las líneas editadas, estas plantas fueron analizadas con PCR amplificando Cas9 (Ilustración 24) para buscar plantas que no tuvieran transgenes, de estas se obtuvieron 4 plantas de la línea 1C y una positiva a Cas9 y 7 plantas de la 2C y 3 plantas positivas a Cas9 en esta línea, a estas plantas se les secuencio el genoma (Ilustración 25) y el resultado fue que las ediciones son estables en el genoma, la inserción de adenina en las línea 1C es estable y adicionalmente ocurrió una nueva edición con una inserción de citosina que pudo deberse a una edición nueva o no se detectó en la secuenciación de la generación anterior, para la línea 2C ambas mutaciones son estables en el genoma de las plantas, por lo que la edición será heredable en el genoma de las siguientes generaciones de plantas, en cuanto a la doble inserción de timina no apareció en la subsecuente generación de plantas, esto puede deberse a que la mutación solo había ocurrido en una parte de las células de la planta, por lo que estas ediciones no eran estables y no se heredaron a la siguiente generación, también puede ser probable que se necesitare analizar más plantas de esta línea, pero para corroborarlo se necesitarían analizar más plantas que provengan de la misma línea.

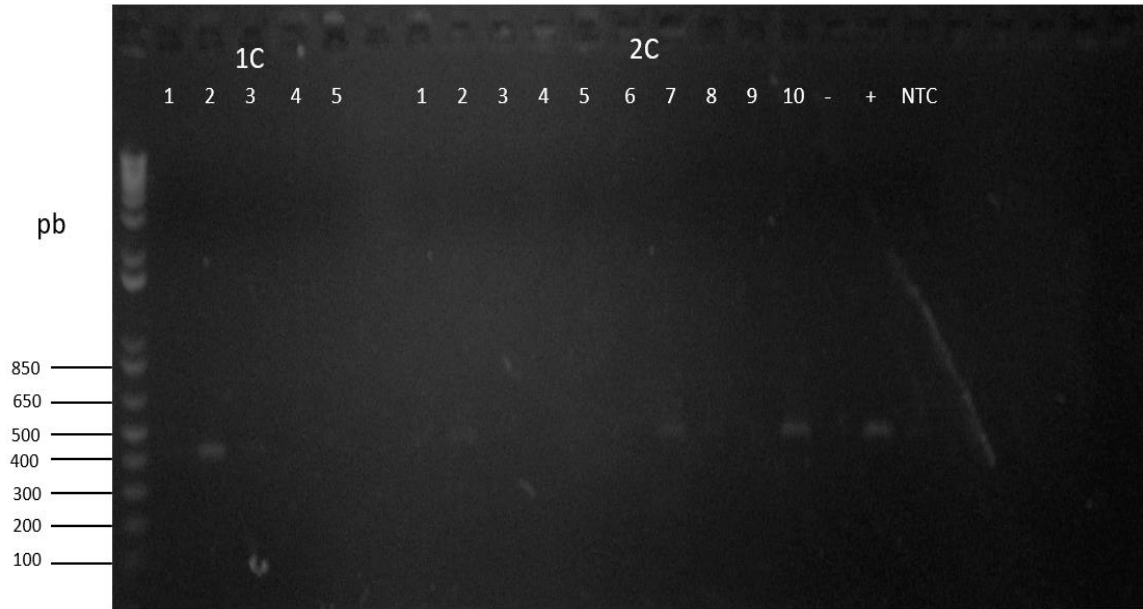


Ilustración 26. Amplificación de Cas9 en líneas editadas de la generación F3, a la izquierda muestras de la línea 1C (1-5), las cuales la planta 2 resulto positiva a Cas9, a la derecha muestras de la línea 2C (1-10), las plantas 2, 7 y 10 resultaron positivas a Cas 9.

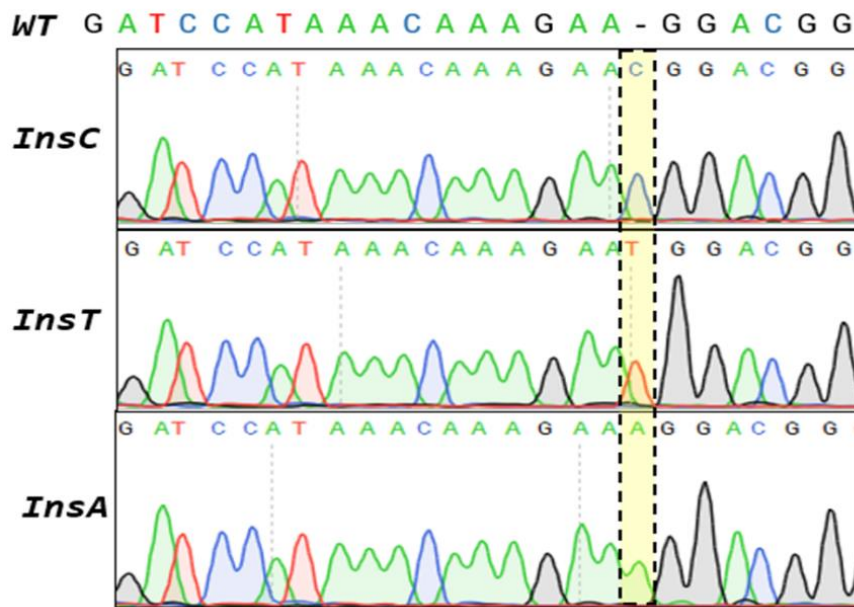


Ilustración 27. Ediciones resultantes de la secuenciación de las líneas 1C y 2C.

En resumen, en este trabajo se obtuvieron solamente inserciones en el genoma de las plantas, en contraste con otros trabajos como el de Wang *et al.*, 2017, que obtuvieron diversas ediciones en los genes de arginasa que editaron en algodón, en su proyecto se obtuvieron sustituciones y deleciones principalmente, pero no inserciones en la secuencia editada, en otro proyecto Zhang *et al.*, 2017, consiguió editar varias plantas de cítricos usando el promotor YAO, en su trabajo reporta que la mayoría de alelos mutados fueron identificados y consistían en inserciones de una base, además de algunas deleciones y sustituciones, citando otro trabajo con edición de genes, Feng *et al.*, 2013, también realizó ediciones en *Arabidopsis* y en arroz, consiguiendo también deleciones, inserciones y sustituciones, cabe señalar que en todos estos trabajos de edición genética se fundamenta en la reparación del ADN por unión de extremos no homólogos (NHEJ), en este sistema, el mecanismo de la célula utiliza ADN ligasa IV para reunir las hebras rotas y en este caso puede ocurrir que las bases puedan ser borradas, o los extremos pudieran haber sido procesados por alguna nucleasa, causando que la reparación sea imperfecta y en consecuencia provoca estas mutaciones, por lo que el sistema genera mutaciones aleatorias en las hebras que repara, pero principalmente deleciones e inserciones en el genoma (Belhaj *et al.*, 2015).

Previamente se mencionó que para mejorar la eficiencia de edición, se sometieron las plantas a un tratamiento de calor, para optimizar la eficiencia de Cas9, aunque la eficiencia de edición va más allá de solo mantener las condiciones óptimas para la proteína, también influyen los promotores que dirigen la expresión de Cas9 en las plantas, y sobre esto se ha investigado como afectan los promotores a la eficiencia de edición de Cas9, en la literatura se han reportado diferentes resultados en la eficiencia de edición que involucran una variedad de promotores que dirigen la expresión de la enzima Cas9 como el sgRNA, estudios en arroz y otras especies, sugieren que factores que influyen, en la eficiencia de edición, incluyen los codones usados para la traducción de Cas9, promotores usados tanto para el sgRNA como para Cas9. Un ejemplo de esto, es el promotor de *ubiquitina*, que aparentemente funciona mejor que el de CaMV 35S en el arroz, otro caso es el de *Arabidopsis*, en el que el promotor CaMV 35S usado para Cas9, solamente generaba quimeras en la generación T1 sin obtener mutantes homocigotos o bialélicos (Feng *et al.*, 2018; Feng *et al.*, 2013), otro caso de un aumento de la eficiencia de edición, es usar el promotor YAO para expresar Cas9 y aumentar la eficiencia de edición en cítricos y usando el promotor U6 para la regulación de la expresión del gRNA (Zhang *et al.*, 2017), el promotor YAO se expresa en células con alta actividad de división celular y como en tejido meristemático (Yan *et al.*, 2015). En otro reporte, editaron plantas de maíz, utilizando el promotor del gen *dmc1* del maíz, el cual lo eligieron por expresarse en meiocitos y el sgRNA fue regulado por el promotor U3 del maíz, con el propósito de editar los gametos de las plantas en la T0 y recuperar mutantes homocigotas o bialélicas en la generación T1, y en este caso obtuvieron una alta eficiencia de edición con un valor reportado del 66% de eficiencia (Feng *et al.*, 2018), con estos estudios, parece ser que para aumentar la eficiencia de edición del sistema de CRISPR/Cas9, depende en cómo es regulada la expresión de Cas9, involucrando también las etapas del desarrollo en donde se quiere editar a las plantas. En este trabajo, los promotores usados para regular la expresión de Cas9 es *ubiquitina 1* del maíz y para el sgRNA el promotor U6 del vector PBUN4U6SM (Núñez-Muñoz, 2017), por lo que para aumentar más la eficiencia de edición con el vector en *A. thaliana*, se tendría que optimizar el vector reemplazando el promotor de *ubiquitina 1* del maíz, por el promotor YAO utilizado por el autor Zhang, de esta forma el vector estaría

optimizado para editar *A. thaliana* y *Citrus sp.*, ya que el promotor esta conservado en ambas especies (Zhang *et al.*, 2017).

Finalmente, mediante un análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de las líneas editadas; se determinó el efecto de las ediciones en el gen de la arginasa y como estas cambiaron la secuencia de los aminoácidos respecto a la secuencia original, en total ocurrieron 3 ediciones, la inserción de adenina, citosina y timina en el genoma, la edición fue traducida en términos de aminoácidos resultando en las siguientes secuencias (tabla XVI):

Sin mutar	Mutación con adenina y citosina	Mutación de timina
MWKIGQRGVVPYFQRLIAAPFTTLRSL PTSLVETGQNRVIDASLTLIRERAKL KGELVRLIGGAKATTALLGVPLGHNS SFLEGPALAPPHVREAIWCGSTNSTT EEGKELKDPVLSVGDIPVQEIREM GVDDDRMLKVVSESVKLVMEEEPLRP LVIGGDHSISYPVVRVAVSEKLGPPVD ILHLDAHPDIYDRFEGNYSSHASSFA RIMEGGYARRLLQVGI RSINKE GRE GKRFVGEQYEMRTFSKDRQMLNKL GEGVKGVIYISIV V V CLDPGFAHGVS E FEPGGLSFRDVLNHLNLQGDVLGAD VV E YNPQRDTADDMTAMVAAKFVREL AAKMSK	MWKIGQRGVVPYFQRLIAAPFTTL RSLPTSLVETGQNRVIDASLTLI RERAKLKGELVRLIGGAKATTAL LGVPLGHNSSFLEGPALAPPHVR EAIWCGSTNSTTEEGKELKDPV LSDVGDIPVQEIREMGVDDDRML KVVSESVKLVMEEEPLRPLVIGG DHSISYPVVRVAVSEKLGPPVDIL HLDAHPDIYDRFEGNYSSHASSE ARIMEGGYARRLLQVGI RSINKE E TGTRQEVWSRTV.	MWKIGQRGVVPYFQRLIAAPFTT LRSLPTSLVETGQNRVIDASLT LIRERAKLKGELVRLIGGAKAT TALLGVPLGHNSSFLEGPALAP PHVREAIWCGSTNSTTEEGKEL KDPVLSVGDIPVQEIREMGV DDDRMLKVVSESVKLVMEEEPL RPLVIGGDHSISYPVVRVAVSEK LGGPVDILHLDAHPDIYDRFEG NYSSHASSFARIMEGGYARRLL QVGI RSINKE T TGTRQEVWSRT V.

Tabla XVI. secuencias sin mutar y mutadas, el color azul claro representa los aminoácidos que componen el gRNA y el verde azulado el lugar donde ocurre la edición, de color verde se representan los aminoácidos con unión a manganeso y en rojo se encuentra un sitio de unión a sustrato.

En la secuencia de aminoácidos resultante la inserción de una base causa un corrimiento en el marco de lectura del gen, por lo que en consecuencia la traducción se ve afectada y termina prematuramente en un codón de paro, esto ocasiona que la proteína pierda 2 sitios de manganeso y 2 de unión a sustrato, de acuerdo a los sitios de interés mencionado en el diseño de gRNAs, además de la pérdida total de 101 residuos de aminoácidos, que comprende entre el exón 5 y 6. En comparación con las secuencias editadas, la proteína original pesa 37.99 kDa, la secuencias mutadas 26.88 kDa, por lo que la proteína perdió un 30% de su peso. Lo más probable es que la proteína expresada tenga una actividad bastante reducida al momento de metabolizar arginina, sin embargo, no sería una pérdida total de su funcionalidad, ya que la proteína aún conserva dos sitios de unión a sustrato y 4 sitios de unión a manganeso, por lo que se esperaría una reducción significativa de la actividad de la arginasa.

Conclusiones:

- Se identificó un potencial gen ortólogo de arginasas en *C. aurantifolia*, utilizando análisis bioinformáticos y validando dichos resultados mediante PCR, secuenciación y RT-qPCR.
- Con el método utilizado, se lograron obtener plantas transformantes de *A. thaliana* y *C. sinensis*, además de que también se obtuvieron plantas editadas del exón 5 en *A. thaliana*.
- Se diseñaron gRNAs para editar las regiones clave que permitan editar el gen *argah2*, en *A. thaliana*. También se logró diseñar un gRNA para la edición en cítricos dirigida a la edición del mismo gen codificante de arginasas y potencialmente otras especies vegetales, además de que el diseño del gRNA permite realizar un ensayo de pérdida de restricción con HindIII e identificar posibles ediciones.
- Se clonaron gRNAs en vectores para edición de genomas basado en el uso de la cepa hipervirulenta *A. tumefaciens* (AGL1) que permitieron la edición efectiva del locus del gen de *argah* en *A. thaliana*.
- Se lograron obtener transformantes de *A. thaliana* y explantes transformados de *C. aurantifolia*
- El protocolo con tratamiento de calor resultó ser útil para aumentar la eficiencia de edición del gen *argah2* de *A. thaliana*.
- En total se obtuvieron 2 líneas editadas para del gen *argah2* logrando editar el exón 5 con 3 líneas mutantes diferentes, consiguiendo segregantes estables para *A. thaliana*.

Perspectivas

- En relación con la obtención de transformantes de *A. thaliana*, resultaría útil obtener transformantes de *A. thaliana* para editar el exón 2 del gen *argah2* y obtener líneas con genotipos de mutación temprana en marco en marco de lectura.
- Sería adecuado realizar una comparación de los efectos fenotípicos de la edición de *argah2* entre los exones 2 y 5
- Para poder seleccionar mejor los explantes de cítricos transformados, es recomendable cambiar de agente de selección por uno que sea más usado en la literatura y ajustar las concentraciones del agente para optimizar la selección, o bien optimizar la selección con glufosinato de amonio y ajustar las concentraciones que necesitan los explantes para usarlo como agente de selección en explantes de cítricos.
- Una vez obtenidas líneas editadas estables, se recomienda llevar cabo un análisis fenotípico de las raíces de las plantas de *A. thaliana* editadas, comparándolas con plantas silvestres, de esta forma se puede comprobar que la edición tuvo un efecto en el fenotipo de las plantas.
- Además de un análisis fenotípico, también se podrían llevar a cabo pruebas de estrés abiótico y comprobar la tolerancia de las plantas con los genes editados.

Referencias:

Anders, C., Niewoehner, O. y Jinek, M. (2015). In Vitro Reconstitution and Crystallization of Cas9 Endonuclease Bound to a Guide RNA and a ADN Target. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 515–537.

Astier J., Gross I., Durner J. (2017) Nitric oxide production in plants: an update. *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/erx420

Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., Patron NJ. y Nekrasov V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Plant biotechnology*. 32. 76-84, doi: 10.1016/j.copbio.2014.11.007.

Brownfield, D.L., Todd, C.D., y Deyholos, M.K. (2008). Analysis of Arabidopsis Arginase gene transcription patterns indicates specific biological functions for Recently diverged paralogs. *Plant Mol. Biol.* 67, 429–440. doi:10.1007/s11103-008-9336-2

Borek, S., Morkunas, I., Ratajczak, W. y Ratajczak, L. (2001). Metabolism of Amino acids in germinating yellow lupin seeds—III. Breakdown of arginine in sugar-starved organs cultivated in vitro. *Acta Physiol. Plant* 23, 141–148. doi:10.1007/s11738-001-0001-5

Chen H., McCaig B. C., Melotto M., Yang He S. y Howe G. A. (2004) Regulation of Plant Arginase by Wounding, Jasmonate, and the Phytotoxin Coronatine. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 44, Issue of October 29, pp. 45998–46007, 2004

Clough S.J. y Bent A. F., (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*. 16(6), 735-743

Corpas, F. J., y Barroso, J. B. (2015). Functions of Nitric Oxide (NO) in Roots during Development and under Adverse Stress Conditions. *Plants (Basel, Switzerland)*, 4(2), 240-52. doi:10.3390/plants4020240

Correa-Aragunde, N., Graziano, M. y Lamattina, L. (2004). Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218, 900–905.

Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A. y Stalon, V. (1986). Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.* 50, 314–352.

D. D. Li, W. Shi y X. X. Deng. (2003) Factors influencing Agrobacterium-mediated embryogenic callus transformation of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) containing the

pTA29-barnase gene. *Tree Physiology*. © 2003 Heron Publishing—Victoria, Canada 23, 1209–1215.

Di Costanzo L, Pique M.E. y Christianson D.W., (May 2007). "Crystal structure of human arginase I complexed with thiosemicarbazide reveals an unusual thiocarbonyl mu-sulfide ligand in the binuclear manganese cluster". *J. Am. Chem. Soc.* 129 (20): 6388–9. doi:10.1021/ja071567j

Doudna Jennifer A., y Charpentier Emmanuelle (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 346. DOI: 10.1126/science.1258096

Dominguez A. A., Lim W. A. y Qi Lei S. (2016) Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 17(1): 5–15. doi:10.1038/nrm.2015.2.

Dutt, M., & Grosser, J. W. (2009). Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 98(3), 331-340.

Ghaderi I., Mohammad M. S. y Mahmoudi A. (2018), Efficient genetic transformation of sour orange, *Citrus aurantium L.* using *Agrobacterium tumefaciens* containing the coat protein gene of *Citrus tristeza virus*. *Pl gene* doi: 10.1016/j.plgene.2018.02.002

Haas J.H., Moore L. W., Ream W. y Manulis S. (1995) Universal PCR Primers for Detection of Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, No. 8. P. 2879-2884.

Integrated Taxonomic Information System (ITIS), *Citrus L.* recuperado el 16/04/2019, tomado de la base de datos en línea, <https://www.itis.gov>.

Feng, C., Su, H., Bai, H., Wang, R., Liu, Y., Guo, X., Liu, C., Zhang, J., Yuan, J., Birchler, J. A. y Han F. (2018). High-efficiency genome editing using a dmc1 promoter-controlled CRISPR/Cas9 system in maize. *Plant biotechnology journal*, 16(11), 1848-1857.

Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D. L., Wei, P., Cao, F., Zhu, S., Zhang, F., Mao, Y. y Zhu J. K. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell research*, 23(10), 1229-32.

Flores, T., Todd, C. D., Tovar-Mendez, A., Dhanoa, P. K., Correa-Aragunde, N., Hoyos, M. E., Brownfield, D. M., Mullen R. T., Lamattina L. y Polacco J. C., (2008). Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant physiology*, 147(4), 1936-46.

Fröhlich A. y Durner, J., (2011) The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): Is one really needed?, *Plant Science* 181, 401– 404, doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.07.014.

Foresi, N., Correa-Aragunde, N., Parisi, G., Caló, G., Salerno, G. y Lamattina, L. (2010). Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* 22, 3816–3830. doi:10.1105/tpc.109.073510

Goldraj, A. y Polacco, J.C. (1999). Arginase is inoperative in developing soybean embryos. *Plant Physiol.* 119, 297–304. doi:10.1104/pp.119.1.297

V. Henzi, D. B. Reichling, S. W. Helm y A. B. MacDermott. (1992) L-proline activates glutamate and glycine receptors in cultured rat dorsal horn neurons. *Molecular Pharmacology* April 1, 1992, 41 (4) 793-801;

Imai, A., Matsuyama, T., Hanzawa, Y., Akiyama, T., Tamaoki, M., Saji H., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Komeda, Y. y Takahashi, T. (2004). Spermidine synthase genes are essential for survival of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 135(3), 1565-73. doi: 10.1104/pp.104.041699

INTAGRI. 2018. La Producción de Limón en México. Serie Frutales Núm. 41. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 5 p.

Jia, H., y Wang, N. (2014). Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PloS one*, 9(4), e93806. doi:10.1371/journal.pone.0093806

Johnson, Xenie y Bouchez, David. (2007). The model species, *Arabidopsis thaliana*. Science Publishers, pp.385-396

Joshi, Vijay & R. y Fernie, Alisdair. (2017). Citrulline metabolism in plants. Springer, *Amino Acids*, Sep;49(9):1543-1559, doi: 10.1007/s00726-017-2468-4.

Khan N. M., Mobin M., Mohammad F. y Corpas F. J., (2014) Nitric Oxide in Plants: Metabolism and Role in Stress Physiology. Springer. ISBN 978-3-319-06710-0.

Khatodia, S., Bhatotia, K., Passricha, N., Khurana, S. M. y Tuteja, N. (2016). The CRISPR/Cas Genome-Editing Tool: Application in Improvement of Crops. *Frontiers in plant science*, 7, 506. doi:10.3389/fpls.2016.00506

Koch A. M., Wernisch M. y Schmickl R. (2008) *Arabidopsis thaliana*'s wild relatives: an updated overview on systematics, taxonomy and evolution. *TAXON*, 933-943. doi: 10.1002/tax.573021

Kozera B. y Rapacz M. (2013) Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genetics*. Springer. 54:391–406

Lammoglia-Cobo M. F., Lozano-Reyes R., García-Sandoval C. D., Avilez-Bahena C. M., Trejo-Reveles V., Muñoz-Soto R. B. y López-Camacho C. (2016) La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. *Investigacion en Discapacidad*, Vol. 5, Núm 2. Pp 116-128

LeBlanc C., Zhang F., Mendez J., Lozano., Chatpar K., Vivian F., I. y Yannick J. (2018) Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress. *The plant journal*. 93, 377-386. doi: 10.1111/tpj.13782

Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 25(4), 402-408.

Mafra V, Kubo KS, Alves-Ferreira M, Ribeiro-Alves M, Stuart R. M., Boava L. P., Rodrigues C.M. y Machado M. A. (2012) Reference Genes for Accurate Transcript Normalization in Citrus Genotypes under Different Experimental Conditions. *PLoS ONE* 7(2): e31263. doi:10.1371/journal.pone.0031263

Maurya A. K. y Rani A. (2017) Nitric Oxide (NO) and Physio-biochemical Adaptation in Plants Against Stress. Springer Nature Singapore Pte Ltd. V. Shukla et al., (eds.), *Plant Adaptation Strategies in Changing Environment*, https://doi.org/10.1007/978-981-10-6744-0_15

McInerney P., Adams P. y Hadi M. Z., (2014), "Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase," *Molecular Biology International*, vol. 2014, Article ID 287430, 8 pages, <https://doi.org/10.1155/2014/287430>.

Megías M., Molist P. y Pombal M. A. (2018) Atlas de histología Vegetal y Animal, Órganos vegetales Raíz, Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología, Universidad de Vigo.

Messner S., Leitner S., Bommassar C., Golderer G., Gröbner P. Werner E. R., y Werner-Felmayer G. (2009) Physarum nitric oxide synthases: genomic structures and enzymology of recombinant proteins. *Biochem. J.* No. 418, 691–700. doi:10.1042/BJ20080192

Moore A. G. (2001) Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *citrus* from molecular markers. *TRENDS in Genetics*, Vol. 17 No.9.

Mysore K. S., Bassuner B., Deng Xiao-bing, Darbinian N. S., Motchoulski A., Ream W., y Gelvin Stanton B. (1998) Role of the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 Protein in T-ADN Transfer and Integration. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 11:7, 668-683

Núñez Muñoz L. A. (2017) Edición del genoma vegetal con potencial para generar variedades tolerantes a sequía. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México.

PubChem Database, National Center for Biotechnology Information. Arginine, CID=6322, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6322> (accessed on Apr. 18, 2019)

Ran F. A., Hsu P. D., Lin C-Y. Jonathan G. S., Konermann S., Trevino A. E., Scott D. A. Inoue A., Matoba S., Zhang Y. y Zhang F. (2013) Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell*, Elsevier Inc. 154, 1380–1389.

Evert R. F. & Eichhorn S. E. (2013). *Raven Biology of Plants*. 8th. ed. W.H. Freeman and Company. New York.

SAGARPA. (2016). cítricos limón, naranja y toronja mexicanos, Planeación Agrícola Nacional 2016-2030.

SAGARPA & FAO, (2014), México: el sector agropecuario ante el desafío del cambio climático, Ciudad de México, pp. 437, E-ISBN 978-92-5-308585-9.

Shargool, P.D., Jain, J.C. y McKay, G. (1988). Ornithine and arginine biosynthesis and degradation in plant cells. *Phytochemistry* 27, 1571–1574. doi:10.1016/0031-9422(88)80404-7

Al-Shehbaz Ihsan A. y O’Kane, Steve L. (2002) Taxonomy and Phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae). *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0001

Shen X.L., Takano T., Liu S.K., y Bu Y.Y., (2018), The expression pattern of ArgAH1 and ArgAH2 genes in *Arabidopsis thaliana*, *Genomics and Applied Biology*, 9(3): 14-19 (doi: 10.5376/gab.2018.09.0003)

Shi H., Ye T., Chen F., Cheng Z., Wang Y., Yang P., Zhang Y. y Chan Z. (2013). Manipulation of arginase expression modulates abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*: effect on arginine metabolism and ROS accumulation. *Journal of Experimental Botany*. 64(5): 1367-1379

Slocum, R.D. (2005). Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 729–745. doi:10.1016/j.plaphy.2005.06.007

Scora, R. (1975). On the history and origin of Citrus. *Bull. Torrey Bot. Club* 102: 369-375

Sun, H., Tao, J., Zhao, Q., Xu, G., y Zhang, Y. (2016). Multiple roles of nitric oxide in root development and nitrogen uptake. *Plant signaling & behavior*, 12(1), e1274480. doi:10.1080/15592324.2016.1274480

Swingle, W.T. (1943) The botany of Citrus and its wild relatives of the orange subfamily. In *The Citrus Industry*. (Vol I) (Webber, H.J. and Batchelor, L.D., eds), pp. 129–474, University of California Press

Verbruggen N. y Hermans C. (2008). "Proline accumulation in plants: a review". *Amino Acids*. Nov 35 (4): 753–759. doi:10.1007/s00726-008-0061-6

Wang, Y., Meng, Z., Liang, C., Meng, Z., Wang, Y., Sun, G., Zhu, T., Cai, Y., Guo, S., Zhang, R. y Lin, Y. (2017). Increased lateral root formation by CRISPR/Cas9-mediated editing of arginase genes in cotton. *Sci China Life Sci* 60. doi: 10.1007/s11427-017-9031-y

Winter G., Todd CD., Trovato M., Forlani G. y Funck D., (2015) Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front. Plant Sci.* 6:534. doi: 10.3389/fpls.2015.00534

Witte Claus P. (2010) Urea metabolism in plants. *Plant science*, vol. 180 pp. 431–438

Wu G, Morris SM (November 1998). "Arginine metabolism: nitric oxide and beyond". *The Biochemical Journal*. 336. (Pt 1): 1–17.

Yan L., Wei S., Wu Y., Hu R., Li H., Yang W. y Xie Q. (2015) High efficiency genome editing in *arabidopsis* using YAO promoter driven CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant* 8:1820–1823

Yang Li, Wang C., Wang L., Xu C. y Chen, K. (2013). An efficient multiplex PCR assay for early detection of *Agrobacterium tumefaciens* in transgenic plant materials. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 37. 157-162. 10.3906/tar-1009-1265.

Zhang X., Zhang Xi., Takano T., Liu S., y Bu Y. (2014). The Research Progress of Plant Arginase and the Roles in Stresses, *Cell Biology and Biophysics*, Vol.3, No.1 1-6, doi:10.5376/cbb.2014.03.0001.

Zhang F., LeBlanc C., Irish V. y Yannick J. (2017). Rapid and efficient CRISPR/Cas9 gene editing in Citrus using the YAO promoter. *Plant Cell Reports*. Vol. 36, doi: 10.1007/s00299-017-2202-4.

Zonia, L. E., Stebbins, N. E. y Polacco, J. C. (1995). Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant physiology*, 107(4), 1097-103.