

Obtención de plantas de cacao modificadas con el gen RGA2 de *Solanum bulbocastanum* mediante CRISPR-Cas9 para resistencia por *Phytophthora* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides*

Andrés Ramírez¹, Diana Velasco¹, Juan Camilo García¹, Sara Galeano¹, Miguel Octavio Pérez², Sara Ramírez², Javier Torres²

1. Estudiantes de Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Salud. I.U. Colegio Mayor de Antioquia. 2. Docentes de Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Salud. I.U. Colegio Mayor de Antioquia.
Autor de correspondencia: sara.ramirez@colmayor.edu.co

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao*) es un árbol de la familia *Malvaceae*, cultivado por sus semillas comestibles. Sus semillas son procesadas para obtener cacao en polvo, manteca de cacao y chocolate, donde Colombia es el quinto productor después de Brasil y Ecuador (Castañeda, et al 2023). El factor que limita la producción de cacao en el país es la presencia de enfermedades, como por ejemplo la mazorca negra y la antracnosis foliar del cacao.

Objetivo general

Obtener plantas de cacao editadas genéticamente con el gen RGA2 de *Solanum bulbocastanum* mediante CRISPR-Cas9 resistentes a los hongos *Phytophthora* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides*.

Objetivos específicos:

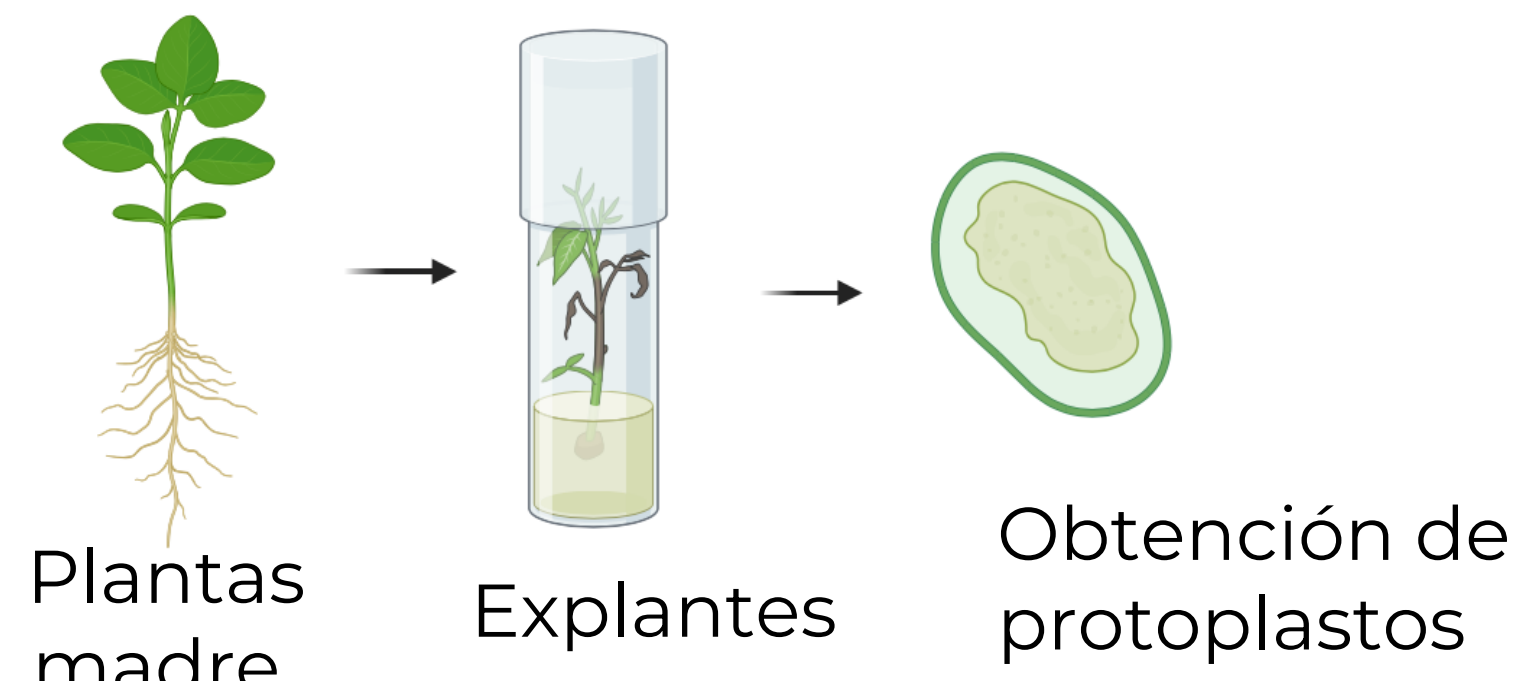
- Editar plantas de cacao con el gen RGA2 mediante la técnica de CRISPR- Cas9.
- Analizar molecularmente la presencia y expresión del gen RGA2 en las plantas de cacao *in vitro*.
- Evaluar la resistencia adquirida mediante CRISPR- Cas9 en plantas de cacao *in vitro* para *Phytophthora* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides*.

Bibliografía

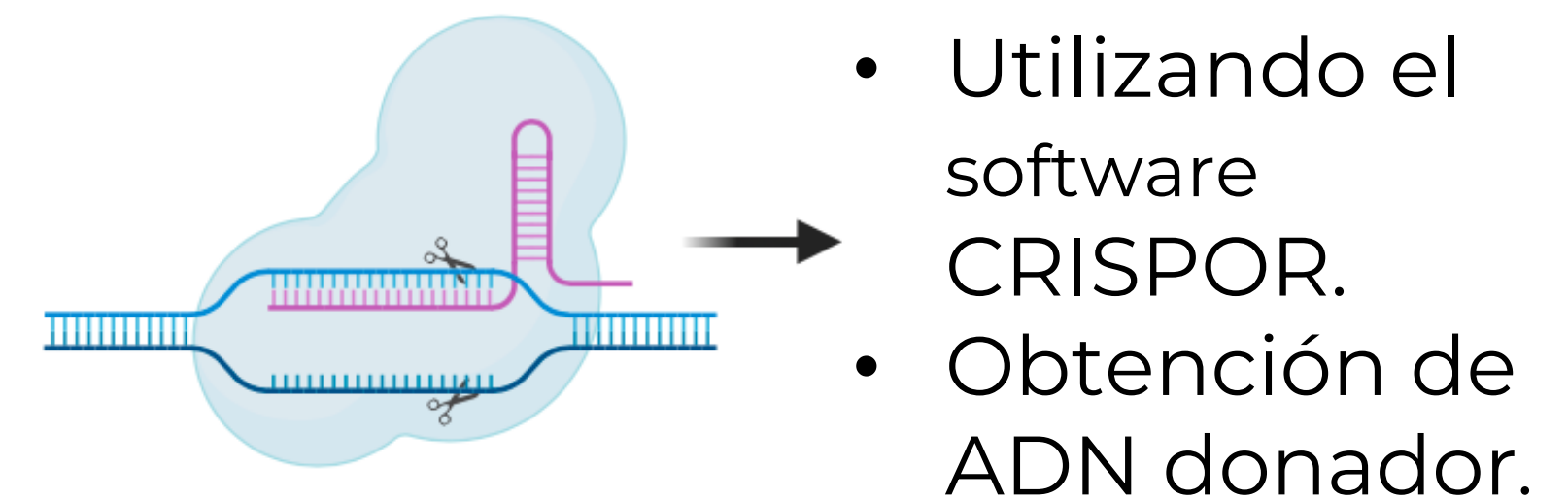
- Fedecacao. (11 de Febrero de 2021). Obtenido de Fedecacao: <https://www.fedecacao.com.co/post/la-produccion-nacional-sigue-creciendo-en-2021-logra-un-nuevo-record-historico>.
- Concordet JP, Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jul 2;46(W1):W242
- Gerashchenkov, GA, Rozhnova, NA, Kuluev, BR et al. Diseño de ARN guía para edición del genoma vegetal CRISPR/Cas. *Mol Biol* 54, 24–42 (2020)
- Guillou, C., Fillodeau, A., Brulard, E. et al. Embriogénesis somática indirecta de *Theobroma cacao* L. en medio líquido y mejora de la tasa de conversión de embrión a plántula. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 54, 377–391 (2018).
- Schwendimann L, Kauf P, Fieseler L, Gantenbein-Demarchi C, Miescher Schwenninger S. Development of a quantitative PCR assay for rapid detection of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* in cocoa bean fermentation. *J Microbiol Methods.* 2015 Aug; 115:94-9.

METODOLOGÍA PROPUESTA

1. Obtención de plantas editadas genéticamente

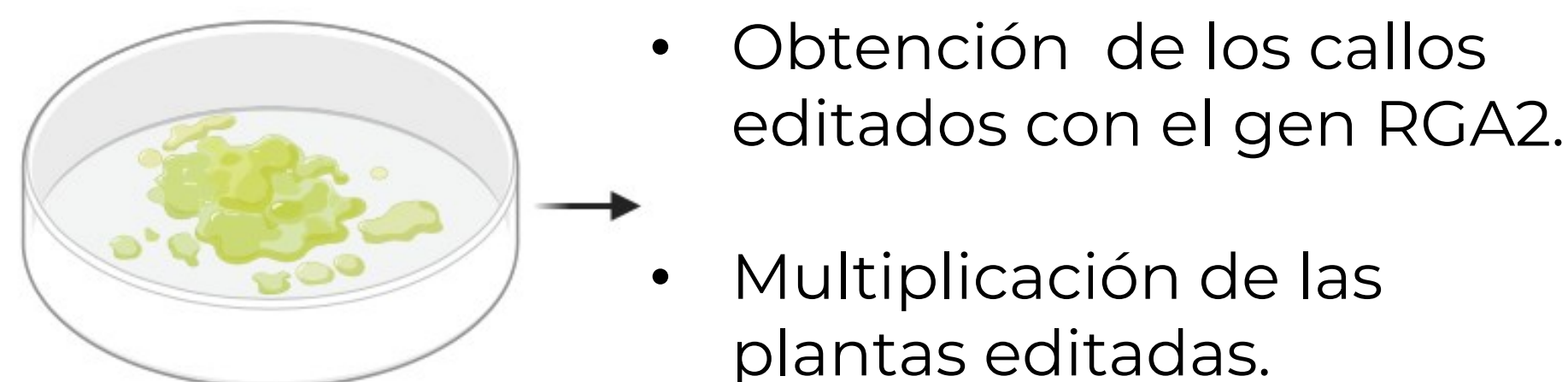


2. Diseño *in-silico* de ARNg.



- Utilizando el software CRISPOR.
- Obtención de ADN donador.

3. Obtención de callos y multiplicación



- Obtención de los callos editados con el gen RGA2.
- Multiplicación de las plantas editadas.

4. Pruebas moleculares



- Análisis de PCR y PCR en tiempo real.
- Western Blot.

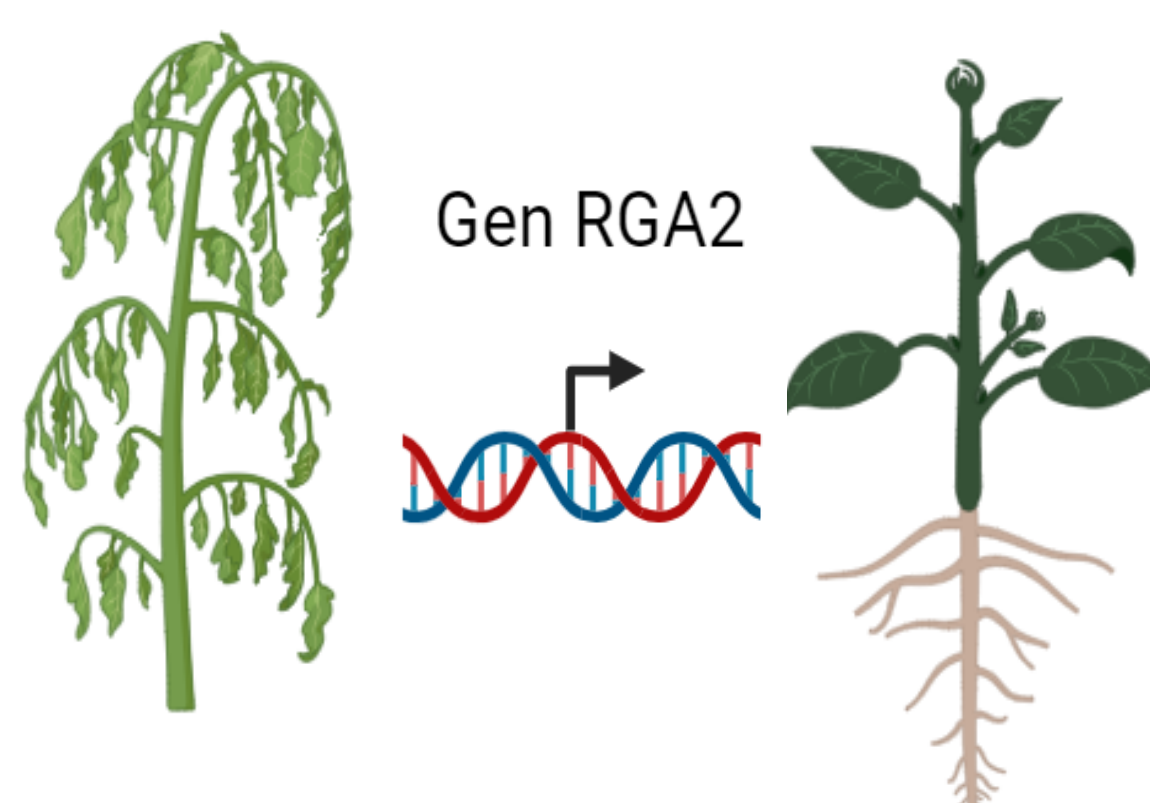
5. Diseño experimental

	<i>Phytophthora</i> sp [Baja]	<i>Phytophthora</i> sp [Media]	<i>Phytophthora</i> sp [Alta]	<i>C.gloeosporioides</i> [Baja]	<i>C.gloeosporioides</i> [Media]	<i>C.gloeosporioides</i> [Alta]	Ambos hongos [Baja]	Ambos hongos [Media]	Ambos hongos [Alta]
	1x10 ⁶ UFC/mL	1x10 ⁷ UFC/mL	1x10 ⁸ UFC/mL	1x10 ⁶ UFC/mL	1x10 ⁷ UFC/mL	1x10 ⁸ UFC/mL	1x10 ⁶ UFC/mL	1x10 ⁷ UFC /mL	1x10 ⁸ UFC/mL
Planta control	PC vs PspB	PC vs PspM	PC vs PspA	PC vs CgB	PC vs CgM	PC vs CgA	PC vs PspB y CgB	PC vs PspM y CgM	PC vs PspA y CgA
Planta editada con el gen RGA2	PE vs PspB	PE vs PspM	PE vs PspM	PE vs CgB	PE vs CgM	PE vs CgA	PE vs PspB y CgB	PE vs PspB y CgB	PE vs PspA y CgA

6. Análisis estadístico

- ANOVA de dos vías.
- Método de Tukey.

RESULTADOS ESPERADOS Y DISCUSIÓN



- Las plantas editadas genéticamente posean una resistencia significativa en relación a las plantas del control.
- La obtención de plantas de cacao editadas con el gen RGA2 generaran mecanismos de resistencia a las enfermedades mazorca negra y antracnosis foliar.

IMPACTOS

- Demostrar el impacto y el potencial de la biotecnología vegetal en el campo del mejoramiento genético de cultivos.
- Acelerar los programas de mejoramiento genético con el objetivo de otorgar resistencia a la mazorca negra y a la antracnosis foliar.
- Generar un método que permita vencer el factor que limita una mayor producción y comercialización del cacao.