



TALLER CIENTÍFICO



UNIVERSIDAD NACIONAL de MAR DEL PLATA
FACULTAD de CIENCIAS AGRARIAS



Potencial de la edición genética en el mejoramiento vegetal: experiencias en el desarrollo de un nuevo cultivar de lechuga mediante mutación específica

Marisa López Bilbao
lopezbilbao.marisa@inta.gob.ar

Grupo de Transformación y Edición en Asteráceas (lechuga/girasol): Laura Radonic,
Flavia Darqui, Valeria Beracochea.

Gabriela Soto (Lab. Ingeniería Genética Leguminosas)

Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO). INTA-CONICET





La lechuga (*Lactuca sativa*) es una hortaliza de amplio consumo a nivel mundial. Se cultiva en todos los continentes, sobre todo en regiones templadas y subtropicales

En Argentina (superficie implantada de 9.000 ha aprox), ocupa el 3° puesto en importancia junto con la cebolla

Debido a que se consumen las hojas frescas tiene una corta duración post-cosecha, por lo que no es un producto exportable y casi toda su producción se destina al mercado interno

Es el cultivo que concentra el mayor porcentaje de pequeños productores hortícolas del país.



Presenta una serie de características que la hacen muy atractiva como material de trabajo. Se adapta muy bien a condiciones de cultivo a campo, en invernadero y en hidroponía

Estas características hacen que sea un cultivo ideal para el cultivo *in vitro* y la transformación genética.

De hecho es la especie modelo dentro de la familia Asteraceae (girasol, cártamo, crisantemo, dalias, etc) .

En el laboratorio, iniciamos en el 2010, la investigación básica para obtener variedades resistentes a patógenos por transformación genética.

Obtuvimos líneas expresando distintos genes que están en etapa de evaluación a campo. Tesis de licenciatura y doctorales + publicaciones científicas. (2010/2018)

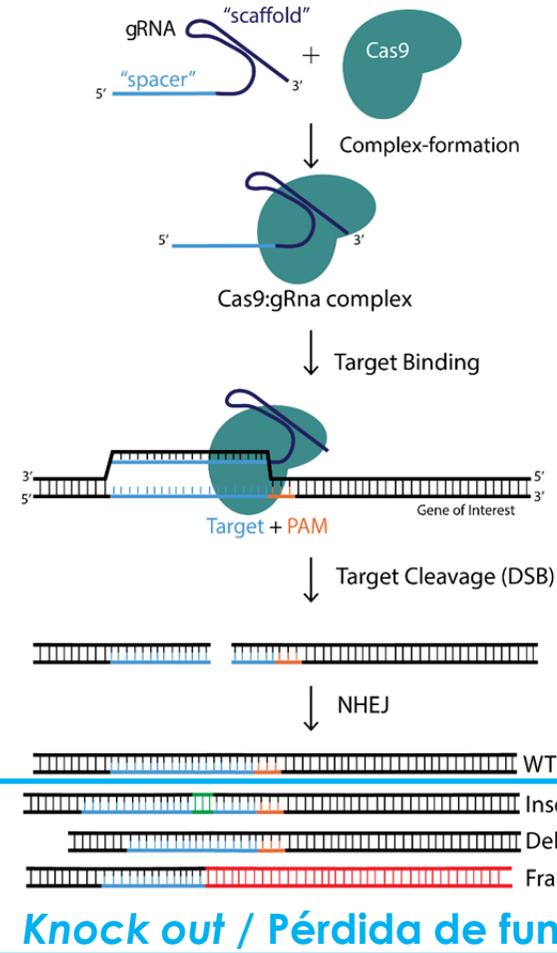
Edición Génica:

permite producir mutaciones sobre genes de interés de modo dirigido

-La tecnología CRISPR/Cas para la edición de los genomas se publicó en el 2012 (las autoras recibieron el Premio Nobel de Química 2020).

-En el 2013 aparece la primera publicación en edición en vegetales modelo.

-Ofrece la posibilidad de realizar mutaciones secuencia-específicas de manera simple, rápida y precisa, superando comparativamente a la mutagénesis convencional (donde se producen alteraciones genéticas al azar en todo el genoma por lo que luego se necesitan analizar varias generaciones para poder seleccionar las plantas que portan el carácter de interés y descartar las que llevan mutaciones no deseadas).

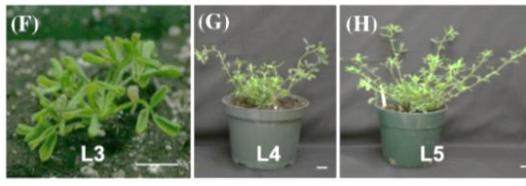
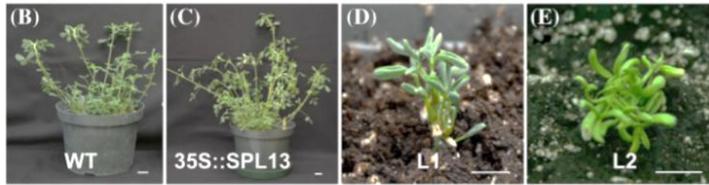


Complejo Cas 9 y gARN se van a unir al sitio en el genoma que se quiere editar y posea el sitio PAM (Protospacer adjacent motif)

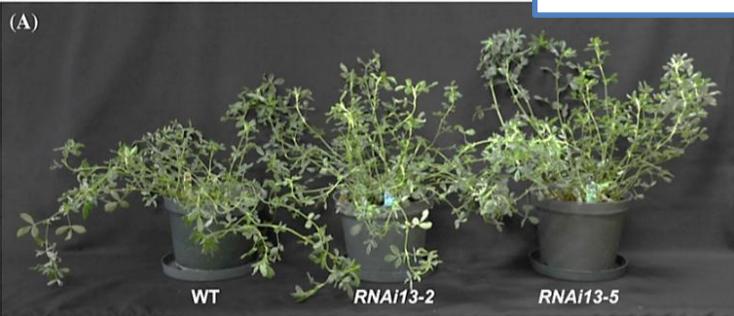
Cortes en la hebra de ADN

Reparados por la maquinaria celular a través de unión de extremos no homólogos-NHEJ (Non Homologous End Joining). Se producen errores

SPL13: Gen miembro de la familia de factores de transcripción SPL (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE)



Plantas transgénicas de alfalfa



SPL13 regulates shoot branching and flowering time in *Medicago sativa*

Ruimin Gao¹ · Margaret Y. Gruber² · Lisa Amyot¹ · Abdelali Hannoufa¹

Received: 30 May 2017 / Accepted: 10 November 2017 / Published online: 17 November 2017
© Crown 2017

Sobreexpresión: retraso del crecimiento y ramas deformadas

Silenciamiento: fase vegetativa más larga, un aumento del área foliar y retraso en la etapa de floración

Caracteres de interés en la producción de lechuga

En 2019

- Dominábamos la transgénesis en lechuga (construcción de vectores, ingeniería genética, cultivo *in vitro*, cultivo en cámaras e invernadero, autorizaciones en CONABIA, etc.)
- En el INTA ya se comenzaba a trabajar en edición génica. Investigadoras del grupo de alfalfa viajaron al lab. de Eduardo Blumwald para aprender a armar los vectores de edición (Davies, California, EEUU)
- Teníamos un gen de interés para modificar en lechuga
- La normativa de Argentina, donde los eventos obtenidos por edición génica son evaluados caso por caso y no por su proceso de obtención. La ausencia de inserción de ADN foráneo, se considerara como un cultivo convencional, no OGM
- Nos asociamos dos grupos del CICVyA para dirigir la tesis de Valeria Beracochea

Para editar el gen de interés se identificó la región *target* de LsLOC111889983 por PCR

ATGGACTGGAATTTGAAGATACCTT**CTTGGGATTTACAGA**
ATTCGAACAAGGAACAATTCCCAACATTGATTGACTAGTG
 GGTCGAGTAGTTATGGAGGGCAGGGGATTAAGGGAATTTT
 TGTGTGCGATTTAAAGCTTGGCCAAGTAATCGATTCAGGAAAC
 GAGTTGAAGTCCACATCAAAAATGGCGCTATCACCTTCAGCT
 TCATCCAAAAGGGCACGTCCTATAAATAACACGATTCCGGC
 CGCCACTTGCCTCGTTGACGGCTGCAACGCCGACCTCAGTA
 ACTGCAA**AGTATCATCGCCGCATAA**GGTCTGTGAAATC
 CATTCCAAAACCGCTCAGGTTTCCATTAATGGTCAAAGCAA
 CGATTCTGCCAGCAATGTAGCCG

➔ Secuencia Slp13 1°Exón Lechuga
 Primers 293 pb



Se confirmó el 100% de identidad de la secuencia

Diseño de los guías:

- Software: CCTop (secuencia de *Lactuca sativa*)
- Elección de los guías:
 1. Hibridar en primer o segundo exón
 2. Hibridar perfectamente en el gen de interés
 3. Mínima cantidad de off targets
 4. Máximo cuidado de las zonas conservadas

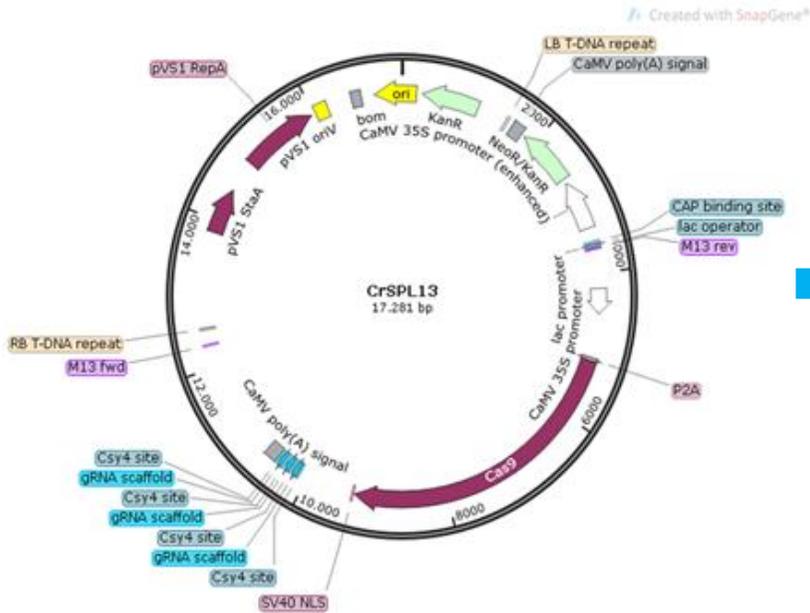
GTGAAAGTGGATTATGGACTGGAATTTGAAGATACCTTCTTGGGATTTACAGA
 ATTCGAACAAGGAACAATTC**CCAACATTGATTGACTAGTGGG**TCGAGTAGTTA
 TGGAGGGCAGGGGATTAAGGGAATTTCTGTGTGATTTAAAG**CTTGGCCAAG**
TAATCGATTCAGGAAACGAGTTGAAGTCCACATCAAAAATGGCGCTATCACCTT
 CAGCTTCATCCAAAAGGGCACGTCCTATAAATAACACGATTCCGG**CCGCCACTT**
GCCTCGTTGACGGCTGCAACGCCGACCTCAGTAACTGCAAAGAGTATCATCGCC
 GCCATAAGGTCTGTGAAATCCATTCCAAAACCGCTCAGGTTTCCATTAATGGTCA
 AAAGCAACGATTCTGCCAGCAATGTAGCCGGTATGACTCTCT

Guía 1 Guía 2 Guía 3

ACAATTC **CCA** **ACATTGATT** CGACTAGTGGGTCGA...GAAAGCTTGGCCAAGTAATCGATTC **AGG** AAAC...CCGG **CCG** **CCACTTGCTCGTTGACGGG** CAACGTG

5'...ATG _____ TGA...-3'

LsSPL13



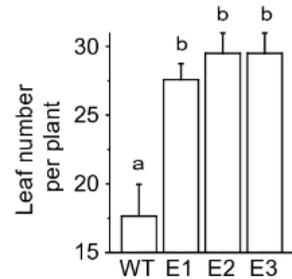
Introducción de la maquinaria de edición (delivery) vía *Agrobacterium tumefaciens*

Ensayos de transformación genética

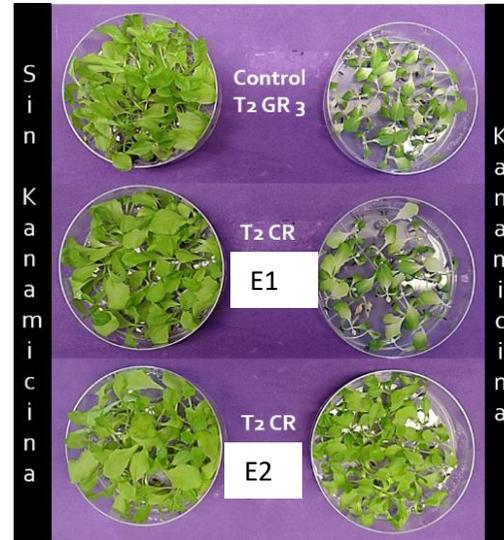
Obtención de la T0, pasaje a invernáculo, detección de la edición (PCR genes Cas9 y secuenciación directa por Sanger)

Obtuvimos 6 líneas editadas

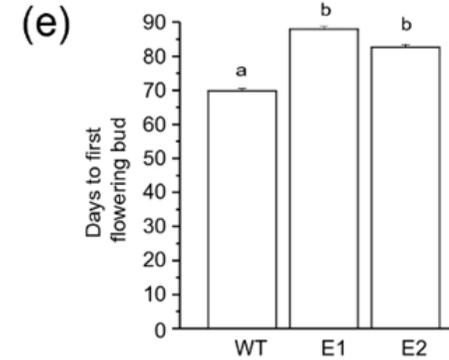
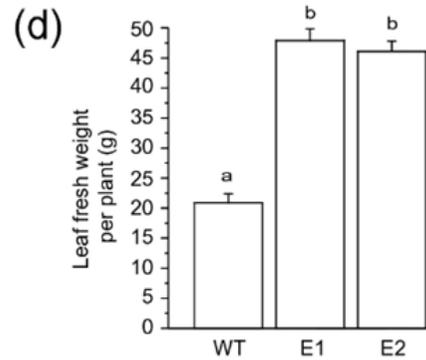
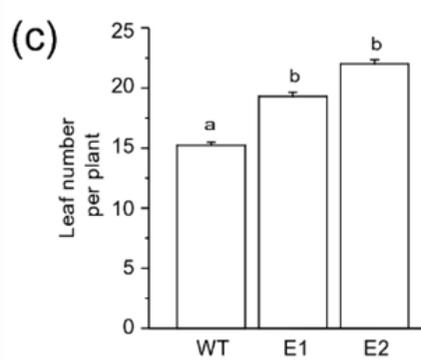
Al evaluar la generación T1 nos quedamos con estas 3 líneas editadas



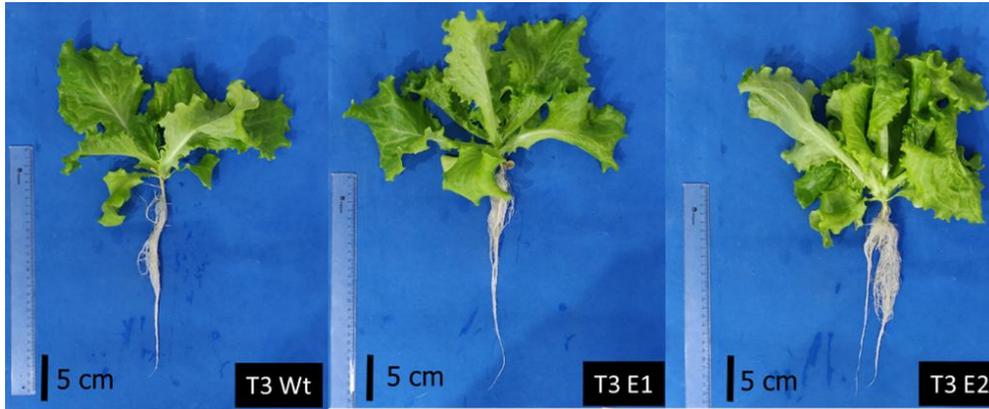
En la generación T1 analizamos por Next Generation Sequencing las 3 líneas y confirmamos que estaban editadas en ambos alelos.



Datos tomados de plantas correspondientes a la generación T2

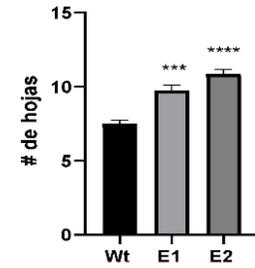


Validación fenotipo plantas T3. Ensayos en Hidroponia

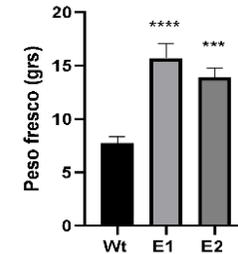


Fotos del ensayo a los 38 días

Hidroponia control N° hojas

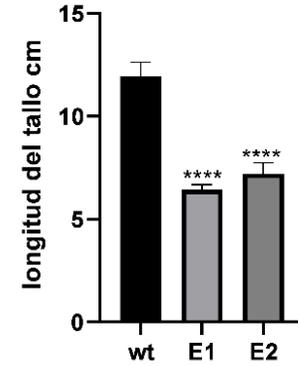
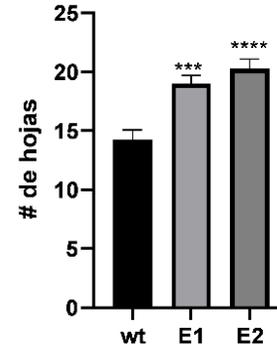


Hidroponia control biomasa aereo

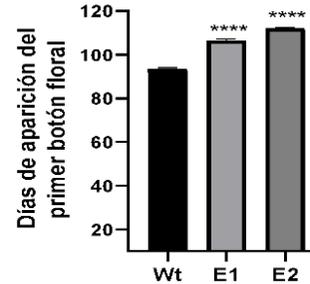


Validación fenotipo plantas T3, en invernáculo

Evaluación planta adulta (50 días)



Evaluación planta adulta floración (114 días)



<0.0001

Logros

Implementar la edición génica en lechuga

Obtener plantas de lechuga mejoradas por el *knock out* del gen *LsSPL13*, que presentan dos caracteres de alto interés en la producción de esta hortícola: mayor biomasa y floración retrasada.

Confirmamos el potencial biotecnológico de este gen.

Tesis Doctoral de Valeria Beracochea (8/4/2024)

Plant Cell Reports
<https://doi.org/10.1007/s00299-022-02952-0>

FOCUS ARTICLE



CRISPR/Cas9-mediated knockout of SPL13 radically increases lettuce yield

Valeria Beracochea¹ · Margarita Stritzler^{1,2} · Laura Radonic¹ · Emilia Bottero^{1,2} · Cintia Jozefkowicz^{1,2} · Flavia Darqui¹ · Nicolás Ayub^{1,2} · Marisa López Bilbao¹ · Gabriela Soto^{1,2}

Received: 6 October 2022 / Accepted: 4 November 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Cultivated lettuce (*Lactuca sativa* L.) is a diploid SPL13 gene (Additional File 1). Contrary to their parental

Proyecto
Biodesarrollar de
Agricultura Ganadería
y Pesca. Subsidio para
fase final de
desarrollos
biotecnológicos

ICP favorable del 11/03/2024 por lo que puede ser manejado como material convencional.

Ensayos a campo en 3 sitios INTA



TALLER CIENTÍFICO

Gracias

por su atención



UNIVERSIDAD NACIONAL de MAR DEL PLATA
FACULTAD de CIENCIAS AGRARIAS

