

Edición de Genomas en el CIAT: Una tecnología disruptiva para acelerar el mejoramiento de las plantas

Joe Tohme, CIAT, Palmira, Colombia



**Our vision,
a sustainable food future**

Our mission: reduce hunger and poverty, and improve human nutrition in the tropics through research aimed at increasing the eco-efficiency of agriculture

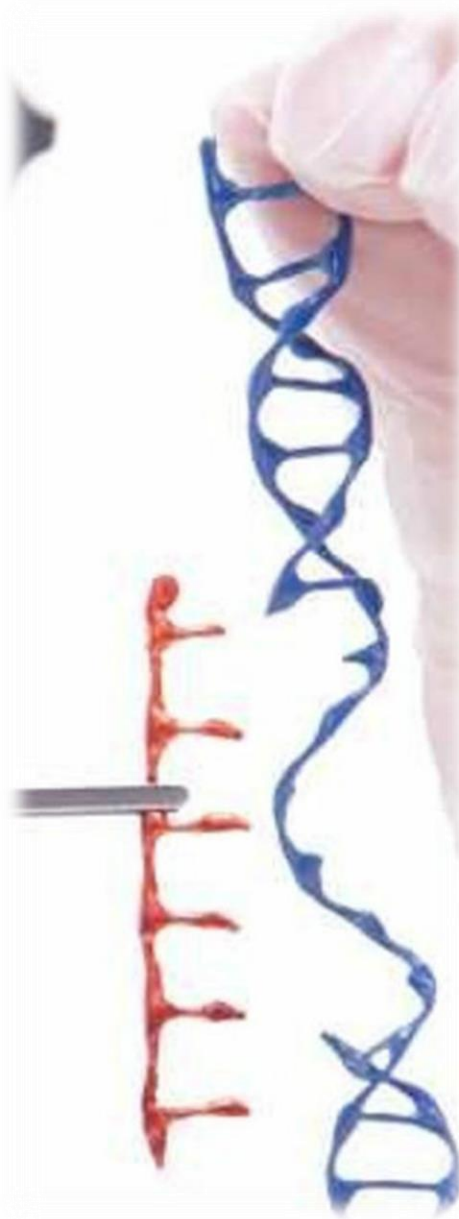
**Nuestra visión,
la sostenibilidad alimentaria
futura**

Nuestra misión: reducir el hambre y la pobreza, y mejorar la nutrición humana en los trópicos mediante una investigación que aumente la eco-eficiencia de la agricultura



Qué es editar un genoma?

Producir cambios/mutaciones planeadas, permanentes y heredables, en un sitio específico del genoma, mediados por los sistemas de reparación del ADN en la célula, con la menor probabilidad de cometer errores (*off-targets*) y sin dejar secuencias de ADN foráneo



CRISPR-Cas 9

Herramienta revolucionaria con la capacidad de modificar regiones genómicas con alta precisión

Edición de genomas mediante el uso de CRISPR/Cas9

Usos potenciales:

- Cambios puntuales en secuencia para conversión de alelos y fijación acelerada de caracteres
- Silenciamiento de uno o varios genes
- Adición de uno o varios genes
- Bioenergía-Desarrollo eficiente de vías metabólicas

1er Curso Nacional de
Edición de Genomas
para la Agricultura
CIAT, Dec 13-16, 2016



Acelerar el Mejoramiento Edición de Genomas en el CIAT

CRISPR/Cas 9 para mejorar la calidad nutritiva del fríjol

Targets: *Stachyose Synthase (STS)* y *Raffinose Synthase (RS2)*

Position/ Strand	Guide Sequence + PAM Restriction Enzymes	Specificity Score	Predicted Efficiency	Out- of- Frame	Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM	Genome Browser links to matches sorted by off-target score
261 / rev	GTTCCTTAAAGATGACCA TGG PCR primers	100	69 95 0.3 82 64 43 7 + 75	75	0-0-0-0-1 0-0-0-0-0 1 off targets	4:Chr09 16.95 Mbp
354 / fw	ACTCTGTGACCGATTGCA GGG PCR primers	100	56 42 0.1 20 66 50 5 - 73	73	0-0-0-1-0 0-0-0-0-0 1 off targets	2:Chr07 47.78 Mbp

Genome Browser links to matches sorted by off-target score

578,000 578,250 578,500

Phvul.004G007100.1

Diseños de sgRNAs para CRISPR/Cas9

Transformación genética vía *Agrobacterium*



Acelerar el Mejoramiento Edición de Genomas en el CIAT

Desarrollo de cassava “WAXY”

Identificación de las secuencias target para el diseño de CRISPRs

>XXXX_GBSSI_CDS_Genebank accession JF708948.1

ATGGCAACTGTAATAGCTGCACATTTAGTTTCCAAGGAGCTCACACTTGAGCATCCATGCATTAGAGACTAAGGCTAATAATTTG
TTCACACTGGACCCTGGACCCAACTATCACTCCCAATGGTTTAAGGTCCCTCAACACTATGGATAAACTCCAAATGAAGACAC
AATCAAAAGCTGTGAAAAAGTCTCTGCCACCGGCAATGGTAGGCTGCTGCCAAAATTATTTGTGGTCATGGAATGAATTTAA
TCTTTGTTGGAGCTGAAGTTGGTCCCTGGAGCAAACTGGTGGACTTGGTGATGTTCTTGGAGGACTCCCCCTGCCATGGCCG
CAAGAGGGCACCGCGTCATGACAGTGTCTCCCGCTATGACAGTACAAGGATGCTTGGGATACCTCTGTATCGGTGGAGATT
AAAATTGGAGATAGAATTGAAACTGTCCGCTTCTTCACTCCTACAAAAGAGGAGTTGATCGGGTCTTCGTGGATCATCCAATG
TTCTTGAGAAGGTATGGGGCAAACTGGATCTAAAATATATGGCCCAAGAGCAGGTTTGGATTACCAGGACAACCAACTGCG
ATTAGCTTGTTATGCCTTGCTGCTGCTGGAGGCACCGAGAGTTCTGAACCTGAACAGCAGCAAAAATTTCTCAGGACCTACGG
AGAAGAAGTTGCCTTCATTGCCAACGACTGGCACACTGCTCTGCTCCATGTTATCTAAAAGCCATTTACCAACCTATGGGGATT
TACAAACACGCCAAGGTTGCCTTTTGCATCCACAACATTGCATATCAGGGAAGATTGCTTCTCAGACTTCCCACGACTTAATC
TGCCAGATAAATTCAAAAGCTCTTTTGACTTTATCGATGGGTATGAGAAGCCCGTGAAGGGAAGGAAAATCAATTGGATGAAG
GCCGGGATATTGGAATCAGACAGGGTTTGGACTGTGAGCCATACTATGCCCAAGAAGTCATCTCTGGAGTTGAAAGAGGCGT
CGAGCTGGATAACTTCATTCGTAATACTGGCATTGCTGGTATTATAAATGGCATGGACGTCCAGGAGTGGAATCCTGTTACAGA
TAAATACATTGACATCCACTACGATGCCACAAGTGTATGGACGCAAAACCTTTGTTGAAGGAAGCCCTTCAAGCAGAAGTCGG
ATTGCTGTTGATAGGAATGTTCTTTGATAGGCTTCATTGGTAGATTAGAAGAGCAGAAGGGTTGAGATATTTTGTGTCAGC
TATTTCCCAATTGGTTGAACACAATGTGCAGATAGTAATCCTTGGAACTGGCAAAAAGAAATTTGAGAAGCAGATTGAGCATCT
GGAGGTTTTGTACCCTGACAAGGCAAGAGGAGTTGCAAAATCAATGTGCCGTTGGCGCACATGATCACAGCTGGTGCTGACT
TTATGCTGGTTCCAAGTAGATTGAGCCCTGTGGTCTCATTAGTTGCATGCTATGCGATATGGAACAGTTCCCATTTGTTGCTTCT
ACTGGTGGTCTTGTTGATACTGTTAAAGAAGGTTACACAGGATTCCAAATGGGGGCCCTTGC GCGTTGAATGTGACAAAATTGAT
TCAGCAGATGTAGCTGCGATAGTTAAACTGTGGCAAGAGCTCTTGGCACTTATGCTACCGCTGCATTAAGAGAAATGATCCTG
AATTGCATGGCCCAAGACTTGTATGGAAGGGAGCAGCCAGAATGTGGGAGAAAATGCTCCTGGACCTGGAAGTTACTGGCA
GCGAAGCTGGCACTGAAGGGGAGGAGATCGCTCCTCTTGTAAAGGAGAACGTTCCACGCTTGA

Verde: Secuencias sgRNAs.

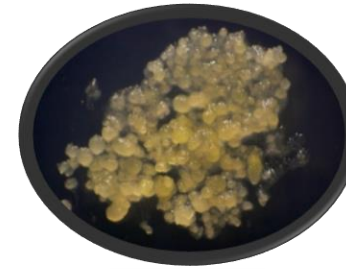
Rojo: Sitios de reconocimiento PAM

Flechas: Sitios de corte de la enzima Cas9

Methodology

Diseño CRISPRs

Transformación genética de cassava



Producción de callo embrionico friable (CEF), desarrollado en CIAT, disponible para su transformación.

(Estado actual)

Contenido de amilosa

Prueba Iodo



wt

waxy

Acelerar el Mejoramiento Edición de Genomas en el CIAT

Edición de Genomas en Arroz Indica para la inducción de mutaciones en los promotores de los genes SWEET para resistencia a las enfermedades

Planta Indica
transgénica
única copia
para el
silenciamiento
de CUATRO
sitios
promotores
de SWEET



Aceleración de Diagnósticos

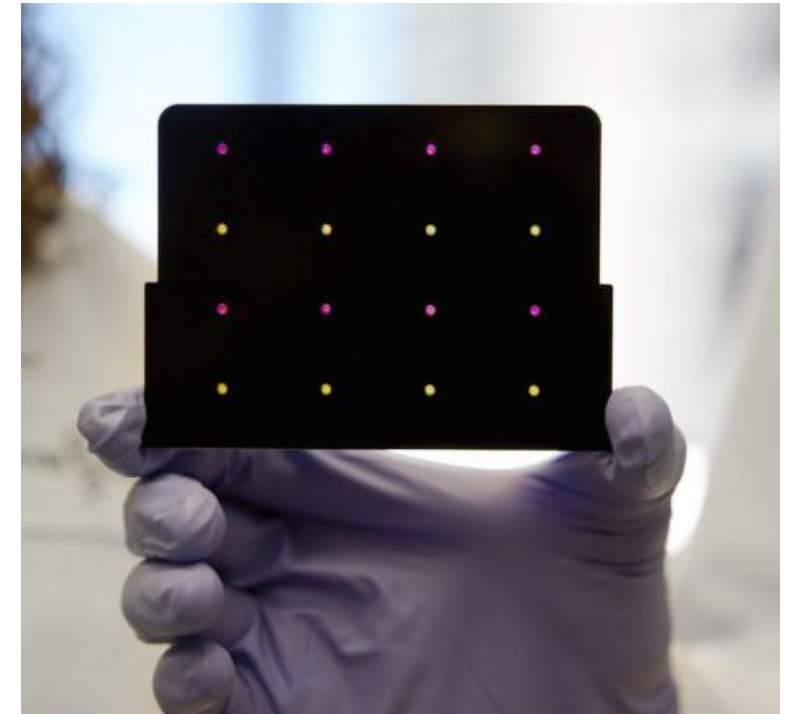
Tecnología Disruptiva del Broad Institute Basada en la Edición de Genomas

Reprogramación de CRISPRs para el diagnóstico de enfermedades –
Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter Un LOCKing (SHERLOCK)
Science April 2017

Speaking of Science

A new CRISPR
breakthrough could lead
to simpler, cheaper
disease diagnosis

By Joel Achenbach April 13



Colaboración CIAT-Broad Institute establecida, Julio 2017

Estatus regulatorio del mejoramiento de plantas mediante edición de genomas

Regulator	Year	Genome Editing	Developer	Plant	Target gene modification (effect)	Novel trait	Regulatory Response	Reference
USDA APHIS	2012	ZFN	Dow AgroSciences	Maize	IPK1 knockout via NHEJ	Reduced phytate production	Non-regulated (non-plant pest)	https://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/DOW_ZFN_IPK1_052610.pdf
USDA APHIS	2015	TALEN	Collectis Plant Sciences	Soybean	Knockout of FAD2-1A and FAD2-1B via NHEJ	High oleic acid	Non-regulated (non-plant pest, non-noxious weed)	https://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/brs_response_collectis_air_fad2k0_soy_cbidel.pdf
USDA APHIS	2015	TALEN	Iowa State University	Rice	Knockout of OsSWEET11 and OsSWEET14 via NHEJ	Bacterial leaf blight resistance	Non-regulated (non-plant pest, non-noxious weed)	https://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/aphis_resp_isu_ting_rice.pdf
USDA APHIS	2016	TALEN	Calyxt	Wheat	MLO knock out via NHEJ	Powdery mildew resistance	Non-regulated (non-plant pest, non-noxious weed)	https://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/15-238-01_air_response_signed.pdf
USDA APHIS	2016	CRISPR/Cas9	Penn State Univ	White button Mushroom	PPO knockout via NHEJ	Anti-browning	Non-regulated (non-plant pest, non-noxious weed)	https://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/15-321-01_air_response_signed.pdf
USDA APHIS	2016	CRISPR/Cas9	DuPont Pioneer	Maize	Wx1 knockout via NHEJ with two different gRNAs	Starch composed exclusively of amylopectin	Non-regulated (non-plant pest, non-noxious weed)	https://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/15-352-01_air_inquiry_cbidel.pdf

Tetsuya Ishii & Motoko Araki (2016) A future scenario of the global landscape regarding genome-edited crops. GM Crops Food 8 (1):44-56.

Plataforma de Edición de Genomas - CIAT

Una Oportunidad para Alianzas y Colaboraciones

- Expertos en cultivo de tejidos, biología molecular, bioinformática y transformación genética
- Laboratorio, invernaderos y campo confinados para realizar ensayos de bioseguridad
- "Strong Stewardship"



Sponsored by Pioneer
October 17-18, 2017
CIAT, Palmira, Colombia

Introduction about the Symposia Series.

Kevin Hayes, Pioneer

Importance of plant breeding innovations.

Kevin Diehl, Pioneer

Disruptive technology for accelerating breeding.

Joe Tohme, CIAT

Development of genome editing technologies.

Masaki Endo, NARO, Japan

Development of transgene-free CRISPR/Cas9
genome-editing methods in plants.

Matthew R. Willmann, Cornell

Application of genome editing in CIAT crops.

Paul Chavarriaga, Sandra Valdes, Maria

Fernanda Alvarez, CIAT

Social perception of genome editing:
Overcoming fears and myths: Panel discussion