



El potencial de l'edició genòmica per a la millora del tomàquet

José Pío Beltrán

**ICEA Universitat Catalana d'Estiu,
Prada 2019**

ELS DESAFIAMENTS DE L'AGRICULTURA

- Augmentar el rendiment de les collites utilitzant menys recursos i protegint la Biodiversitat.
- Desenvolupar collites més resilientes a l'atac per patògens i més tolerants als estressos mediambientals.
- Millorar la qualitat i el valor nutricional dels aliments.
- Aconseguir la Seguretat Alimentària per mitjà d'una agricultura sostenible.

La millora de les plantes és un procés **continu** que ha anat **augmentant la seua velocitat i precisió** des de fa deu mil anys.

Hem seleccionat **mutacions favorables** produïdes de forma natural o induïdes per substàncies químiques o per radiacions.

Al llarg del segle XX es generalitza **l'encreuament sexual de línies pures** per aprofitar **el vigor híbrid** o heterosi.

Al **1982** s'obté la primera planta transgènica

Al **2012** comença **l'edició genòmica** de plantes



To increase variability
Man has been using
physical and chemical
mutagenic agents besides
taking advantage of
spontaneous mutations.



Fotografía
Rafael Fernández
CSIC

Les collites actuals són el resultat d'un llarg procés de domesticació i millora.

Comparar el fruit de la varietat silvestre *Solanum pimpinelifolium* amb el d'un tomàquet actual *Solanum lycopersicum*.

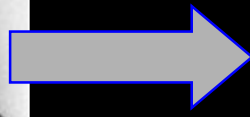
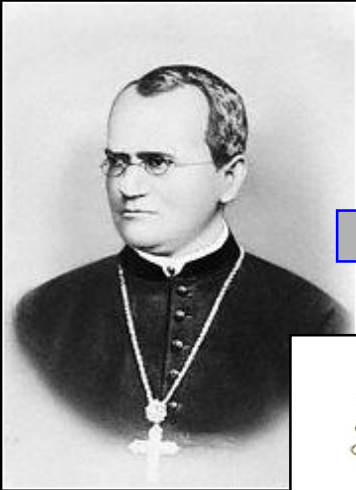
Inicialment la domesticació va perseguir l'augment de la mida del fruit.



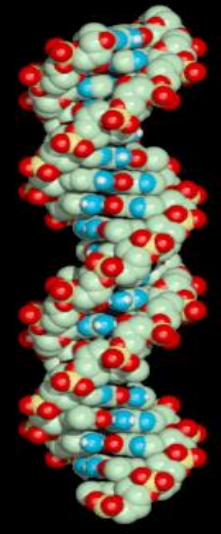
Des de Mendel a l'enginyeria genètica



Genètica Molecular

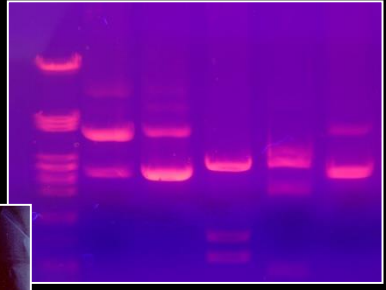
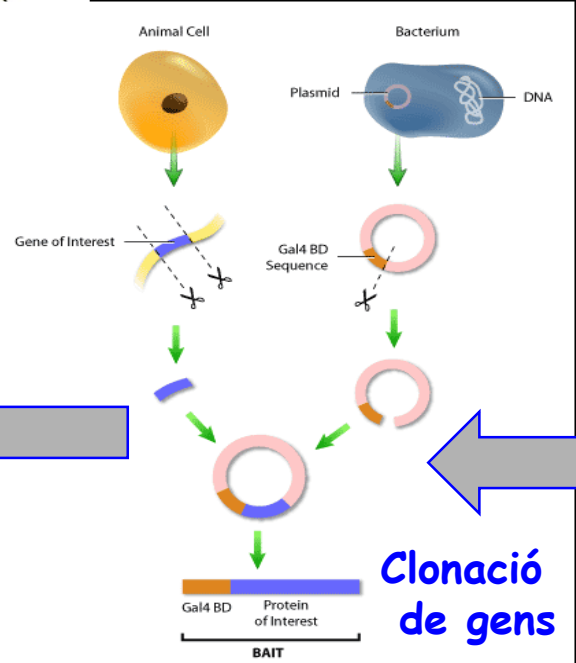


1953



Genètica clàssica

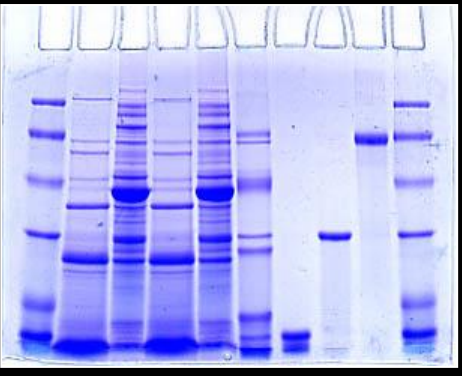
Enginyeria genètica



ADN Recombinant

W. Arber
D. Nathans
H. Smith

1978



Traducció: proteïns

Enginyer genètic a la natura

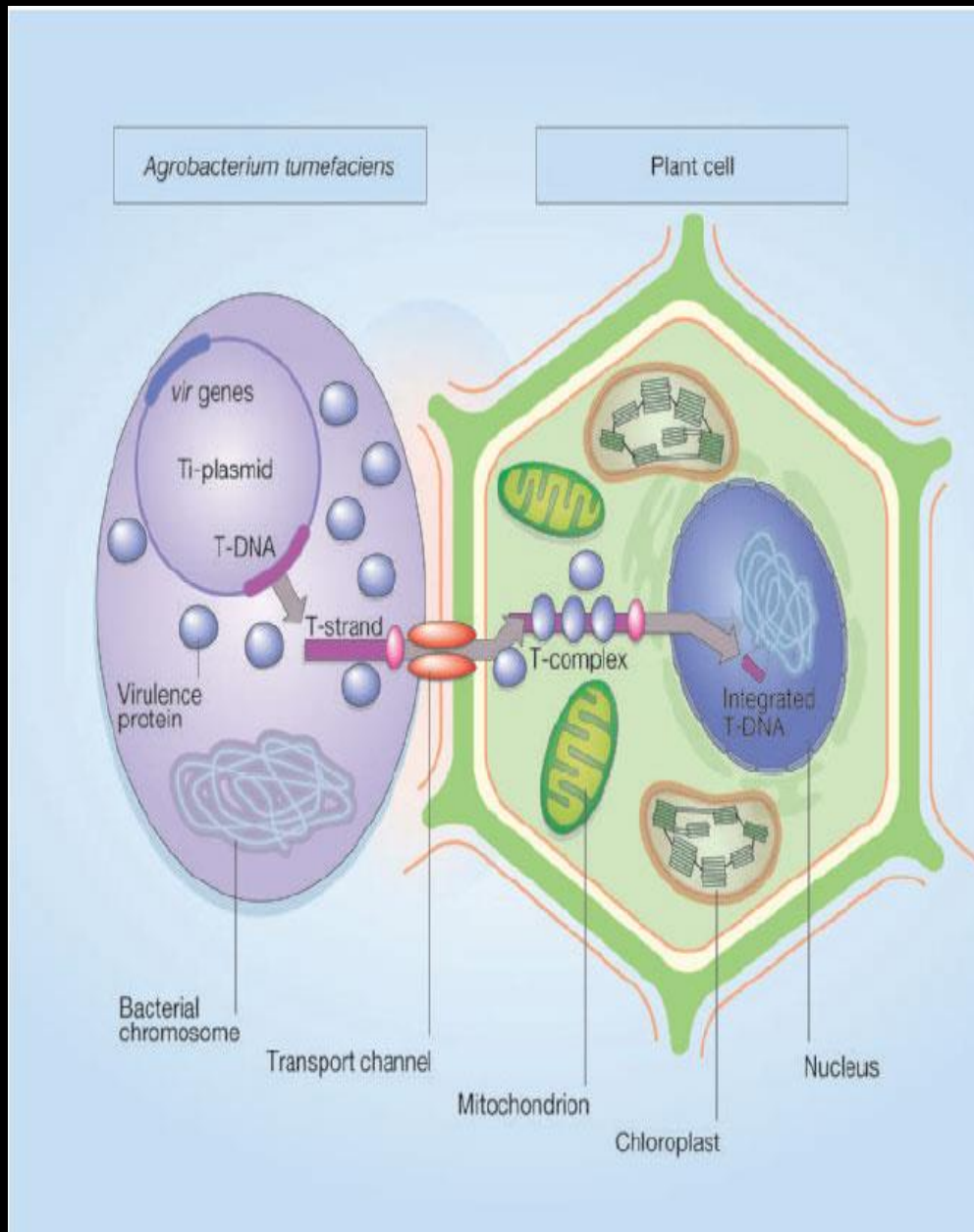
Transformació Genètica de plantes mediada per *Agrobacterium*.

Agrobacterium alberga un plasmidi (Ti) que porta tant gens de virulència (*vir*) com una regió de l'ADN que es pot transferir al genoma de la planta (T-DNA).

Es poden introduïr gens interessants per a la millora de les plantes al T-DNA.

Les cèl·lules ferides de les plantes produeixen compostos fenòlics que activen l'expressió dels gens *vir* d'*Agrobacterium*. Les proteïnes VIR processen el T-DNA.

Agrobacterium fa la transferència del T-DNA a la cèl·lula de la planta. Diverses proteïnes VIR formen un complex capaç de dirigir el T-DNA al nucli cel·lular vegetal.



PRIMERA GENERACIÓ DE CULTIUS TRANSGÈNICS.

- Plantes resistents a l'atac d'insectes.
- Plantes tolerants a l'acció d'herbicides.
- Plantes resistents a l'atac d'insectes i tolerants a l'acció d'herbicides.

A Espanya es conrea únicament blat de moro Bt resistent a l'atac d'insectes (barrinador europeu).

França va prohibir el cultiu de plantes transgèniques des de 2008.

New Plant Breeding Techniques

- Genome editing and modification:
- Oligo-directed mutagenesis (ODM)
- Site directed nucleases (SDN)

Tools for sequence-specific changes in the plant genome:

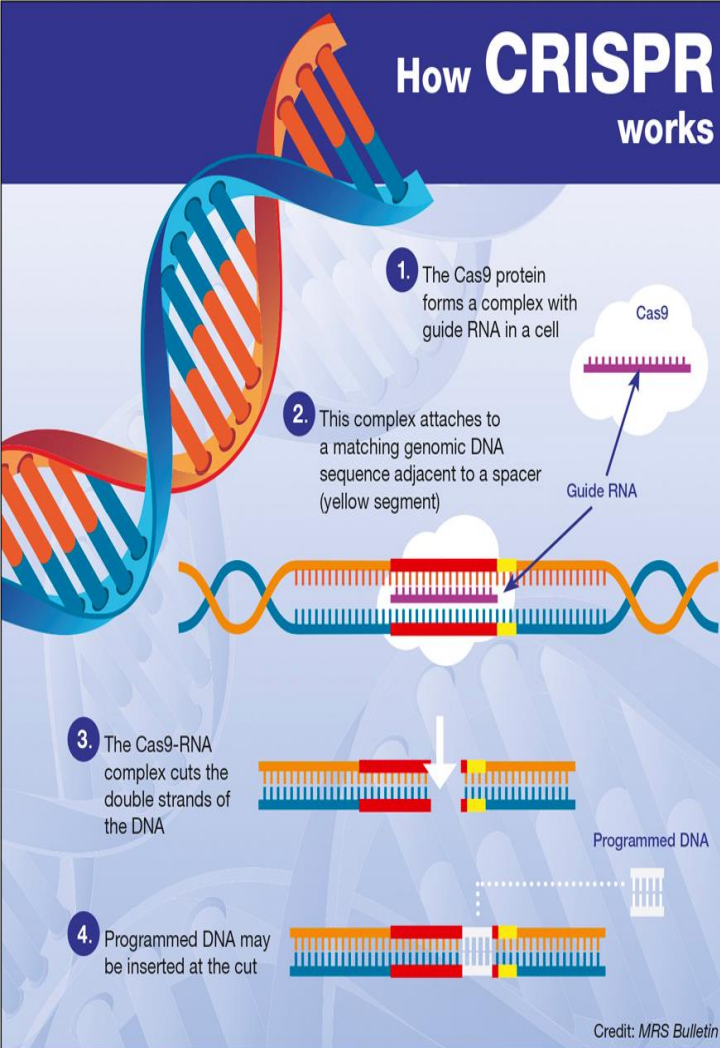
Plant breeders can introduce a single point mutation or a new DNA sequence at a specific location in the genome in contrast to conventional mutagenesis.

Les eines de l'edició genètica CRISPR/Cas9 tallen l'ADN en llocs precisos del genoma.

Fotografia: Lluís Montoliu



How CRISPR works



**Francis M. Mojica de la Uni d'Alacant
descobridor de CRISPR**

ETAPES DE L'EDITAT DE GENS AMB CRISPR/Cas9

1. sgRNA i la proteïna Cas9 s'introdueixen en les cèl·lules.

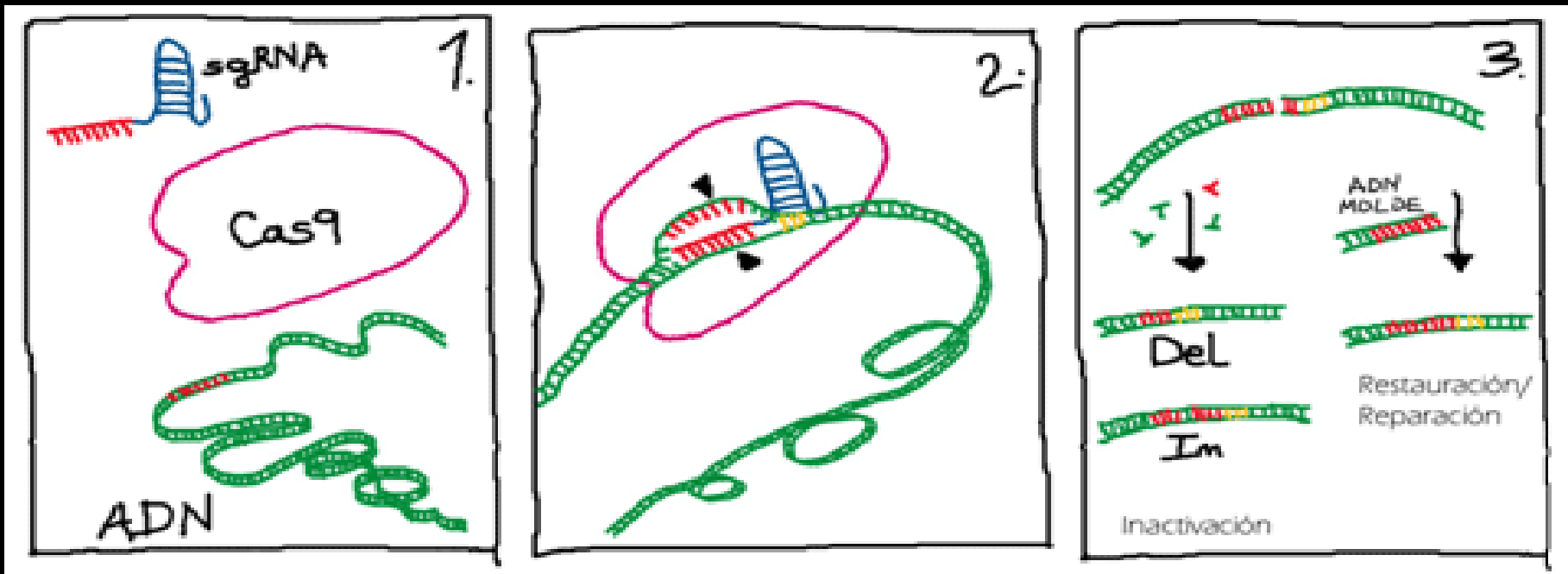
El sgRNA porta una seqüència guia de 20 nucleòtids (en vermell) complementària al gen diana.

2. Es produeix l'emparellament entre seqüència guia i diana.

La proteïna Cas9 reconeix una seqüència de tres nucleòtids PAM (en groc) i talla la doble cadena de DNA.

3. La maquinària cel·lular activa la reparació del DNA.

Si la reparació es produeix amb insercions o delecions s'inactiva al gen. Si utilitzem un motlle podem dirigir la mutació.



La tecnologia CRISPR/Cas9 permet editar diversos gens simultàniament per **inactivació**, per **repressió parcial** o per **activació**.

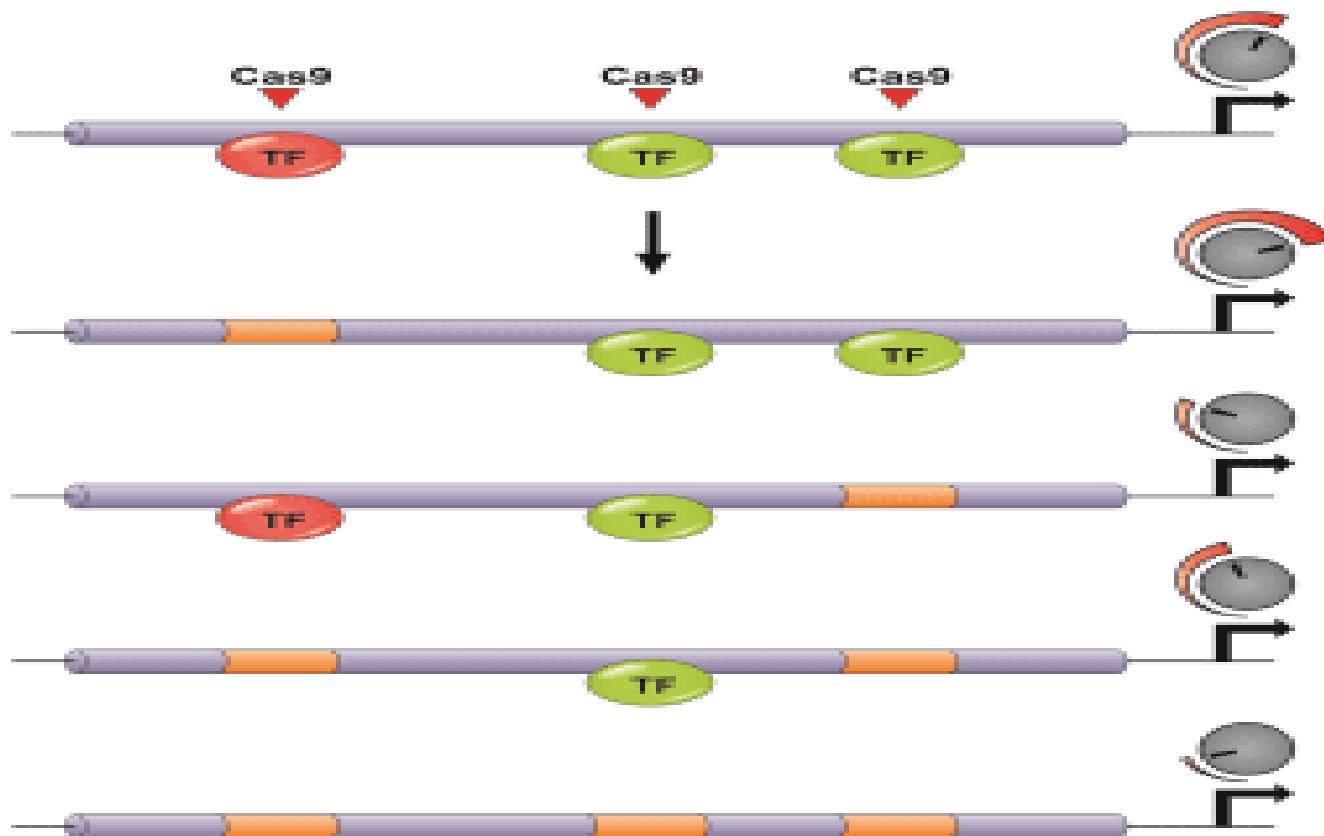


Fig. 1 Editing of cis-regulatory elements for the generation of dosage effect alleles. In contrast to conventional editing of coding sequences, editing of cis-regulatory elements enables the fine-tuning towards optimal gene expression level. Red colour indicates repressive, green colour activating transcription factors. Red Triangles indicate CRISPR cleavage sites. Orange sections indicate CRISPR/Cas-induced mutations

**DISPOSAR DE PLANTES MÉS
PRODUCTIVES I PRESERVAR LA
BIODIVERSITAT:**

**LA IMPORTÀNCIA DELS HÍBRIDS PER PRODUIR
MÉS UTILITZANT MENYS
RECURSOS**

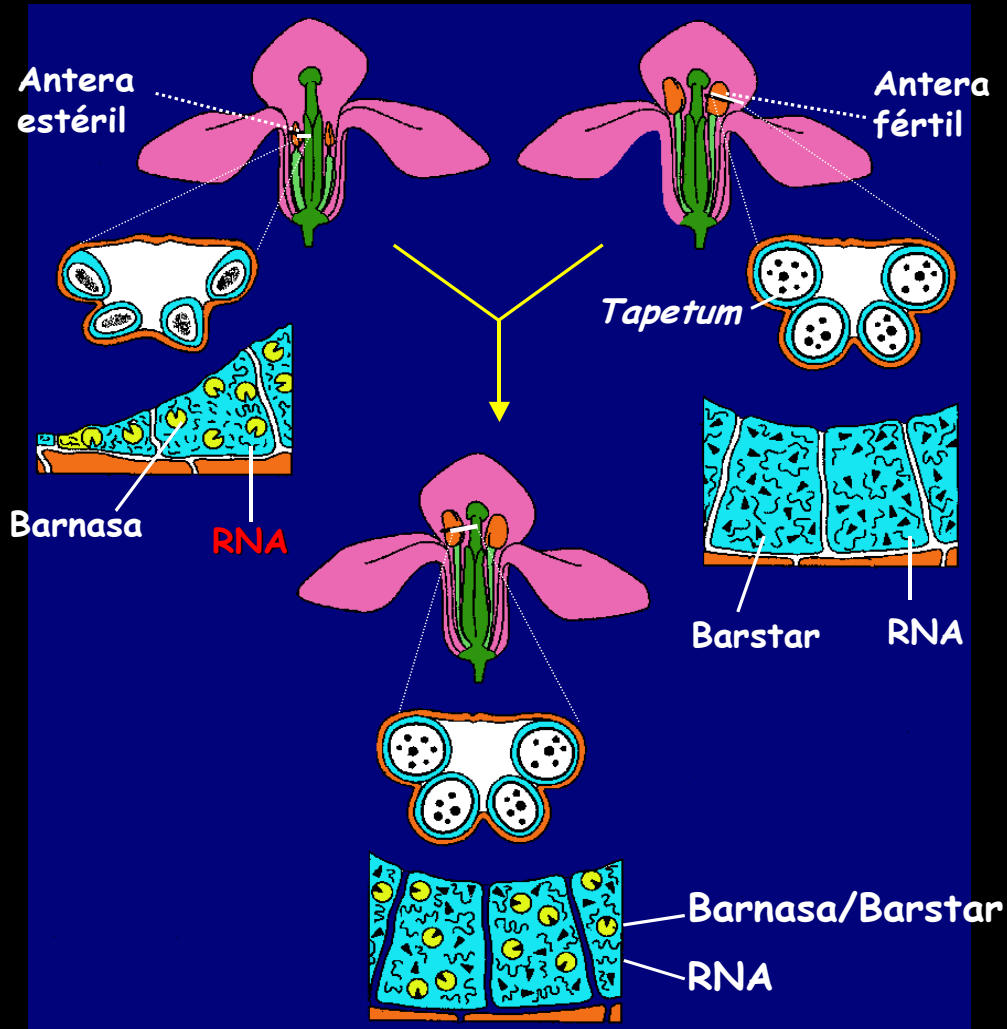
Sistema *TA29*-Barnasa/Barstar

Sistema *END1*-Barnasa/Barstar

IBMCP

Parental androestéril

Parental fértil



F1 híbrida

ANDROESTERILITAT

Requeriments per l'ablació cel·lular

PROMOTOR ESPECÍFIC

GEN CITOTÒXIC

Tabac: *TA29, TA56*

Arabidopsis: *A9, APG*

Tomàquet: *LAT51, LAT56*

Pèsol: *END1*

Proteases

Lipases

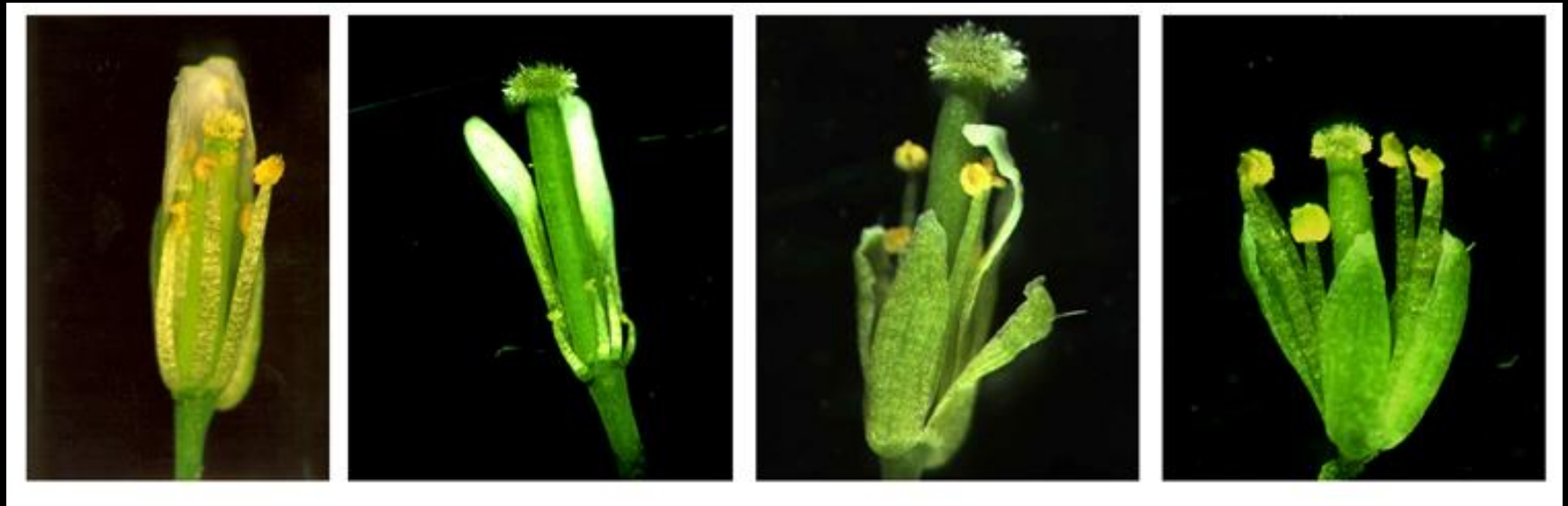
RNases: barnasa i RNasa T1

Toxines: DTA i exotoxina A

RNAs d'interferència

Genes *rol A, B i C*

Restauració de la fertilitat per mitjà de l'encreuament amb plantes transgèniques pEND1::*barstar*



WT

pEND1::*barnasa*

pEND1::*barnasa* / pEND1::*barstar*

Patent internacional P200000814 CSIC-NewBiotechnic

PCT/ESO/1/00127 ACORD EXPLOTACIÓ AMB PBL UK I ASSAIGS EN SYNGENTA

“Biología y Biotecnología del Desarrollo Reproductivo”

**THE USE OF GENETIC
ENGINEERING TO
PRODUCE
CROPS WITH HIGHER
YIELDS**



Androesterilidad y partenocarpia en tomate mediante Ingeniería Genética

Promotor específico de polen

L'androesterilitat indueix la formació de fruits sense llavors (parthenocarpics) en el tomàquet.

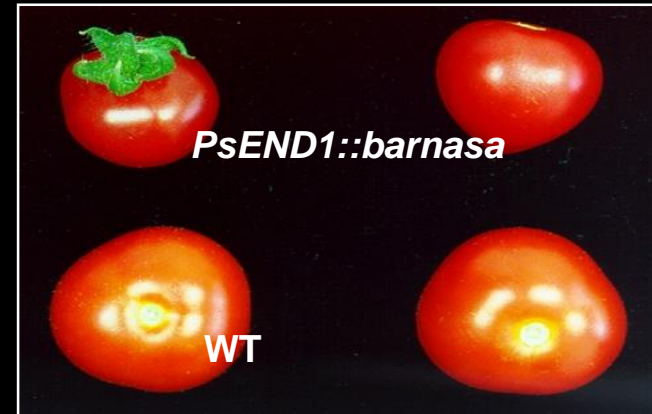
PLANTES DE TOMAQUET RESILIENTS:

Les plantes de tomàquet androestèrils són capaces de quallar fruits independentment de les oscil·lacions de temperatura dia/nit que són un factor crític per a la fertilització i el quallat dels fruits en les plantes de tomàquet.



Cv. Moneymaker

Tomàquet cv. Micro-Tom



Roque E, Ellul P, Gómez MD, Madueño F, Beltrán JP, Cañas LA. 2004. Oficina Española de Patentes y Marcas P200401761. CSIC. PCT/ES2005/070102.

COLLITES RESISTENTS A L'ATAC PER PLAGUES

L'insecte minador *Tuta absoluta* és una de les principals plagues del cultiu del tomàquet a nivell global ja que ocasiona pèrdues entre el 80-100% de la producció quan ataca.



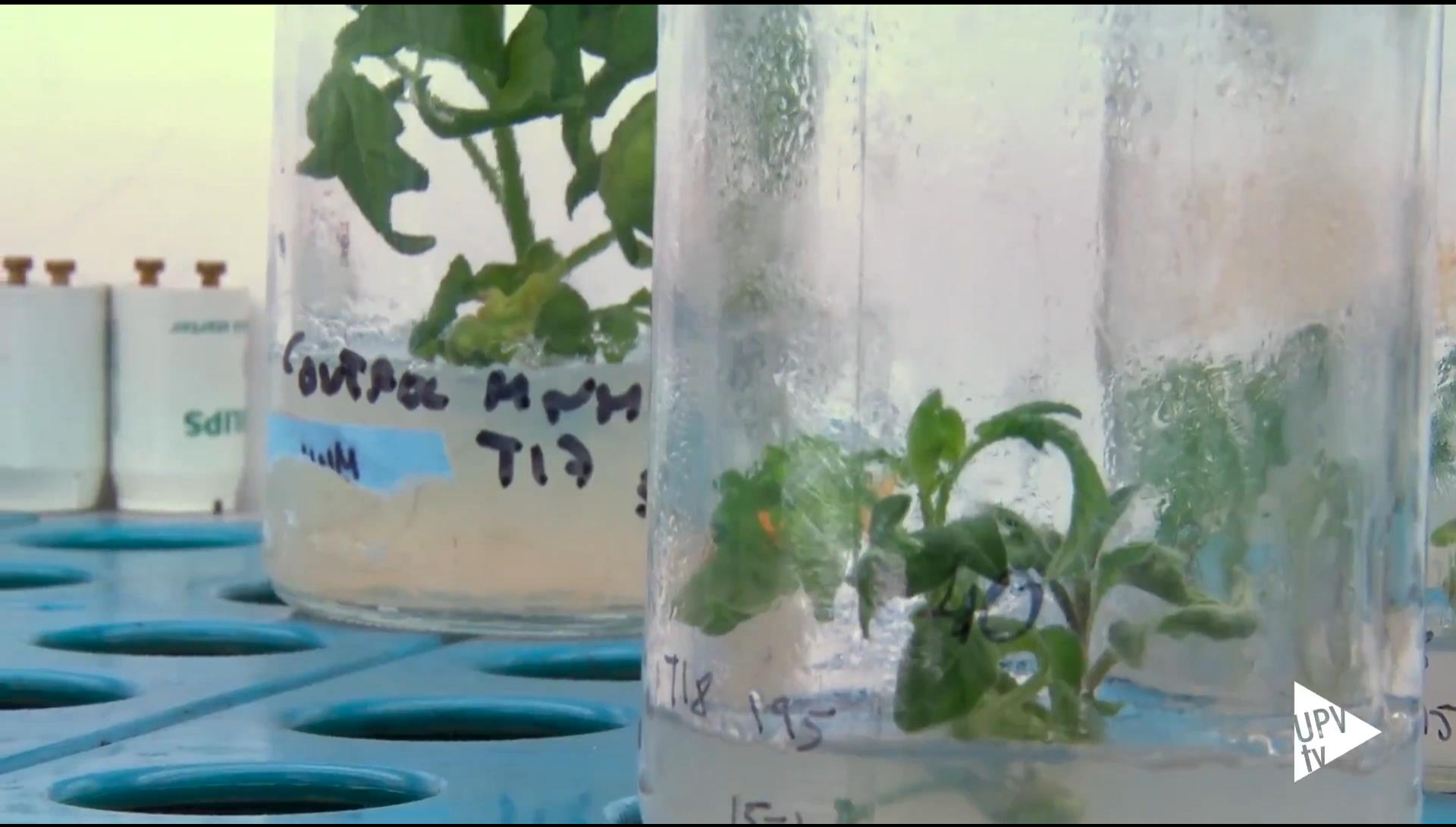
Lesions causades per *Tuta absoluta* en fulles i fruits de tomàquet



Estratègia: Expressar en tomàquet  dos gens que codifiquen inhibidors d'enzims digestius, una cisteïna-proteasa CPI i una serina-proteasa CMe aïllats d'ordi  per dificultar la digestió de *Tuta absoluta*

Resultats: Les larves de *Tuta absoluta* alimentades amb plantes transgèniques CMe-CPI mostren una reducció del pes. Tan sols el **56%** arriba a l'edat adulta i presenten malformacions.





Nesidiocoris tenuis és un depredador de *Tuta absoluta* utilitzat en estratègies de control biològic.

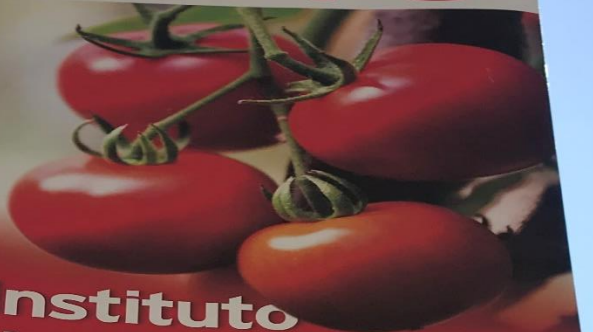
Encara que les plantes transgèniques de tomàquet CMe-CPI atreuen a ***Nesidiocoris tenuis***, tot i això no afecten el seu desenvolupament.



Conclusió:

Pot ser factible utilitzar una estratègia de lluita contra *Tuta absoluta* que combini al mateix temps l'ús de transgènics i el control biològic.

EXCELENCIA
CSIC



**Instituto
de Biología
Molecular
y Celular
de Plantas**



**Modifican tomates para
que sean más resistentes
a las plagas**

www.csic.es



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE ECONOMÍA, INDUSTRIA
Y COMPETITIVIDAD



CSIC
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Tecnologia CRISPR/Cas9 en fruits



Fig. 2 Timeline of the first application of the clustered regularly interspaced short palindromic repeat-CRISPR-associated (CRISPR-Cas9) system in fruit crops

La tecnologia CRISPR/Cas9 es va aplicar per primera vegada al tomàquet el 2014.

Argonaute 7 was knocked out resulting in wiry phenotypes; the first leaves of mutants had leaflets without petioles and subsequently formed leaves lacking laminae.

- I. Resistència a l'estres biòtic.**
- II. Resistència a l'estres abiòtic**
- III. Qualitat de la fruita**
- IV. Domesticació del tomàquet**

Table 2 Current applications of CRISPR-Cas9 in fruit crops

Crop species	Target genes	Target traits	
Resistance to biotic stresses			
Tomato	<i>CP</i> and <i>Rep</i> of virus	Resistance against tomato yellow leaf curl virus	virosis
Tomato	<i>DCL2</i>	Susceptibility to potato virus X, tobacco mosaic virus, and tomato mosaic virus	
Tomato	<i>DMR6</i>	Resistance against downy mildew	
Tomato	<i>MLO1</i>	Resistance against powdery mildew	
Tomato	<i>PMR4</i>	Resistance against powdery mildew	diversos fongs
Tomato	<i>Solyc08g075770</i>	Susceptibility to <i>Fusarium</i> wilt disease	fitopatògens
Tomato	<i>MAPK3</i>	Susceptibility to gray mold disease	
Tomato	<i>JAZ2</i>	Resistance against bacterial speck disease	tacat bacterià
Banana	ORF region of virus	Resistance against banana streak virus	
Cucumber	<i>eIF4E</i>	Resistance against cucumber vein yellowing virus, zucchini yellow mosaic virus, and papaya ring spot mosaic virus	
Grape	<i>MLO7</i>	Resistance against powdery mildew	
Grape	<i>WRKY52</i>	Resistance against gray mold disease	
Cacao	<i>NPR3</i>	Resistance against <i>Phytophthora tropicalis</i>	
Papaya	<i>αEPIC8</i>	Resistance against <i>Phytophthora palmivora</i>	
Citrus	<i>LOB1</i> promoter	Resistance against citrus canker	
Apple	<i>DIPM1, 2, 4</i>	Resistance against fire blight disease	
Resistance to abiotic stresses			
Tomato	<i>BZR1</i>	Decrease in heat stress tolerance	estrès per calor, fred o sequera
Tomato	<i>CBF1</i>	Decrease in chilling stress tolerance	
Tomato	<i>MAPK3</i>	Decrease in drought stress tolerance	
Watermelon	<i>ALS</i>	Resistance against herbicide	

Fruit quality improvement

Tomato	<i>CLV3, lc</i>	Fruits with increasing locule numbers	mida
Tomato	<i>PSY1</i>	Yellow-colored tomato	
Tomato	<i>MYB12</i>	Pink-colored tomato	
Tomato	<i>ANT2</i> (gene insertion)	Purple-colored tomato	coloració
Tomato	<i>PL</i>	Long-shelf life tomato	
Tomato	<i>ALC</i>	Long-shelf life tomato	durada
Tomato	<i>MPK20</i>	Repression of genes controlling sugar metabolism	
Tomato	<i>ANT2</i> (gene insertion)	Increase in anthocyanin content	
Tomato	<i>GAD2, GAD3</i>	Increase in GABA content	
Tomato	<i>GABA-TP1, GABA-TP2, GABA-TP3, CAT9, SSADH</i>	Increase in GABA content	augment de metabòlits d'interès
Tomato	<i>SGR1, LCY-E, Bk, LCY-B1, LCY-B2</i>	Increase in lycopene content	
Tomato	<i>ALMT9</i>	Decrease in malate content	

Fruit crop domestication

Tomato	<i>AGL6</i>	Production of parthenocarpic fruit	fruits sense llavors
Tomato	<i>IAA9</i>	Production of parthenocarpic fruit	

Table 2 continued

Crop species	Target genes	Target traits	Refs.
Tomato	<i>ARF7</i>	Production of parthenocarpic fruit	117
Tomato	<i>MBP21</i>	Generation of "jointless" fruit stem	118
Tomato	<i>GAI</i>	Generation of dwarf tomato plants	119
Tomato	<i>BOP1, BOP2, BOP3</i>	Early flowering with simplified inflorescences	120
Tomato	<i>SP, SP5G, CLV3, WUS, GGP1</i>	Introduction of traits associated with morphology, flower and fruit production, and ascorbic acid synthesis	121
Tomato	<i>SP, OVATE, MULT, FAS, CycB</i>	Introduction of traits associated with morphology, flower number, tomato size and number, and lycopene synthesis	122
Tomato	<i>SP5G</i>	Generation of loss of day-length-sensitive tomato plants	123
Cucumber	<i>WP1</i>	Generation of gynococious plant	124
Groundcherry	<i>SP, SP5G, CLV1</i>	Introduction of traits associated with morphology, flower production, and fruit size	125
Kiwifruit	<i>CEN4, CEN</i>	Generation of a compact plant with rapid terminal flower and fruit development	126

CRISPR-Cas clustered regularly interspaced short palindromic repeat-CRISPR-associated, ORF open reading frame, GABA γ -aminobutyric acid

***Malalties cròniques: el potencial de
la medicina preventiva utilitzant
dietes millorades.***

Malalties cròniques:

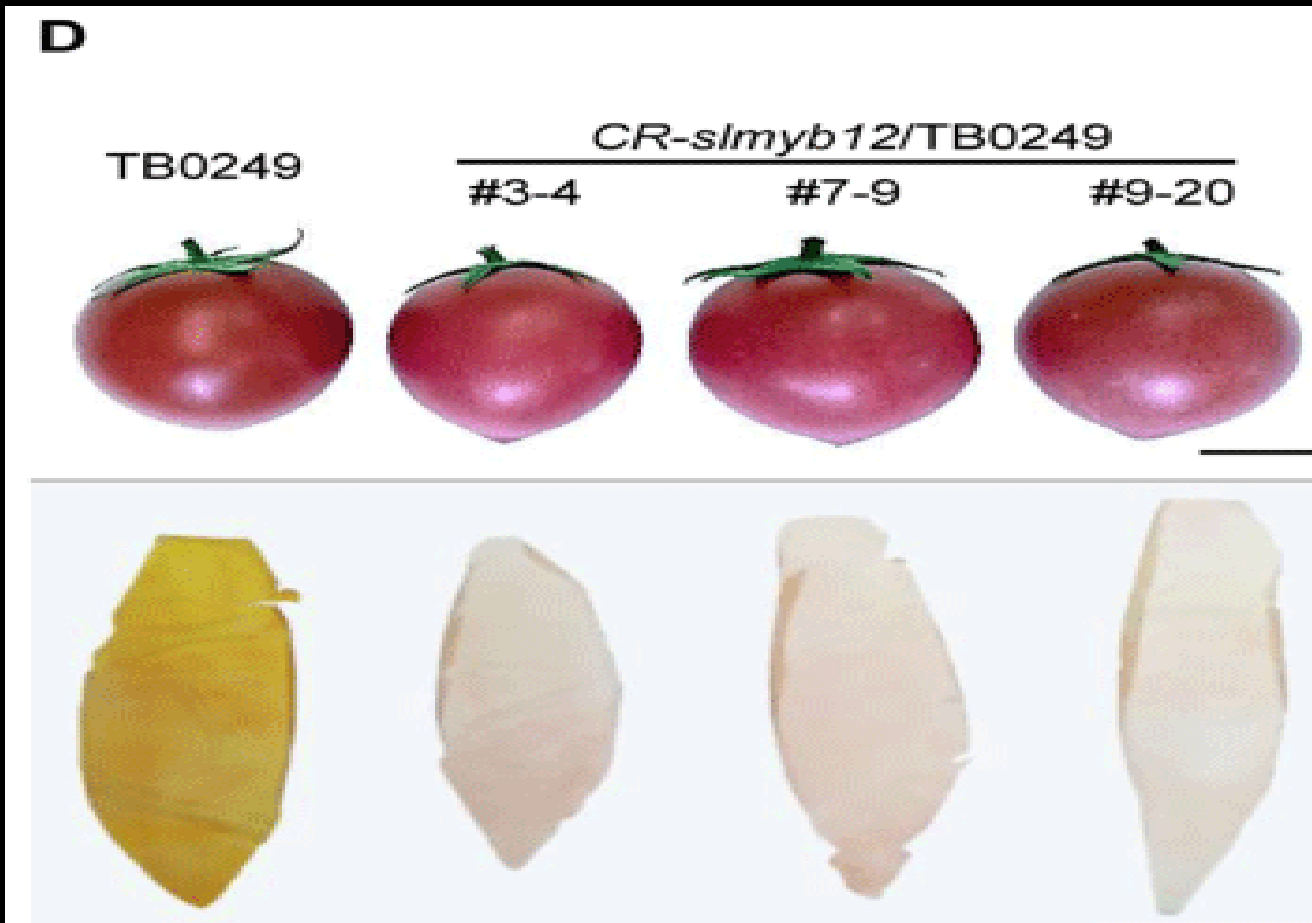
- ❤ Malaltia Cardiovascular (CVD)
- ❤ Diabetis
- ❤ Obesitat
- ❤ Càncer
- ❤ Malalties respiratòries



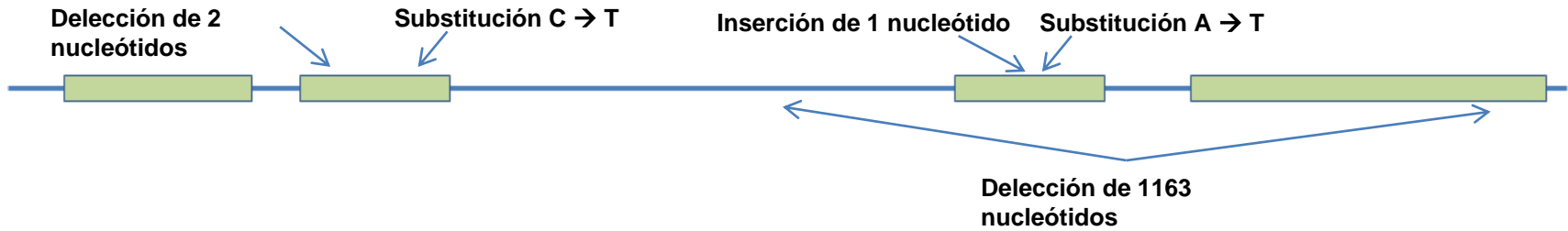
Tomàquets porpra obtinguts per Cathie Martin (JIC, UK) introduint dos gens reguladors de la biosíntesi d'antocianines
Els tomàquets porpra tenen propietats antioxidants.

Els Consumidors europeus i nord-americans prefereixen el **tomàquet vermell** mentre que el **tomàquet rosat** és més popular als països d'Àsia, particularment a la Xina i al Japó.

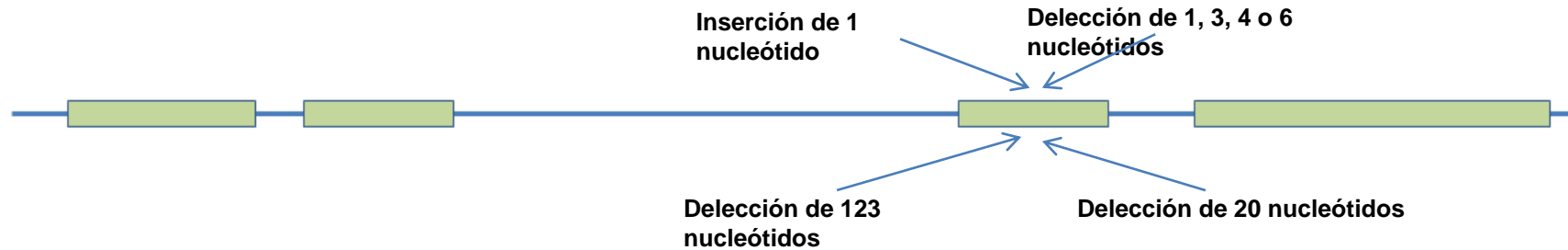
-Pink trait results from the absence of **yellow-colored flavonoid naringenin chalcone (NarCh)** in the peels controlled by the yellow (*y*) locus encoding *SlMYB12* an R2R3-MYB transcription factor. **CRISPR/Cas9 del gen *SlMYB12*** :



Spontaneous mutations



CRISPR-mediated mutations



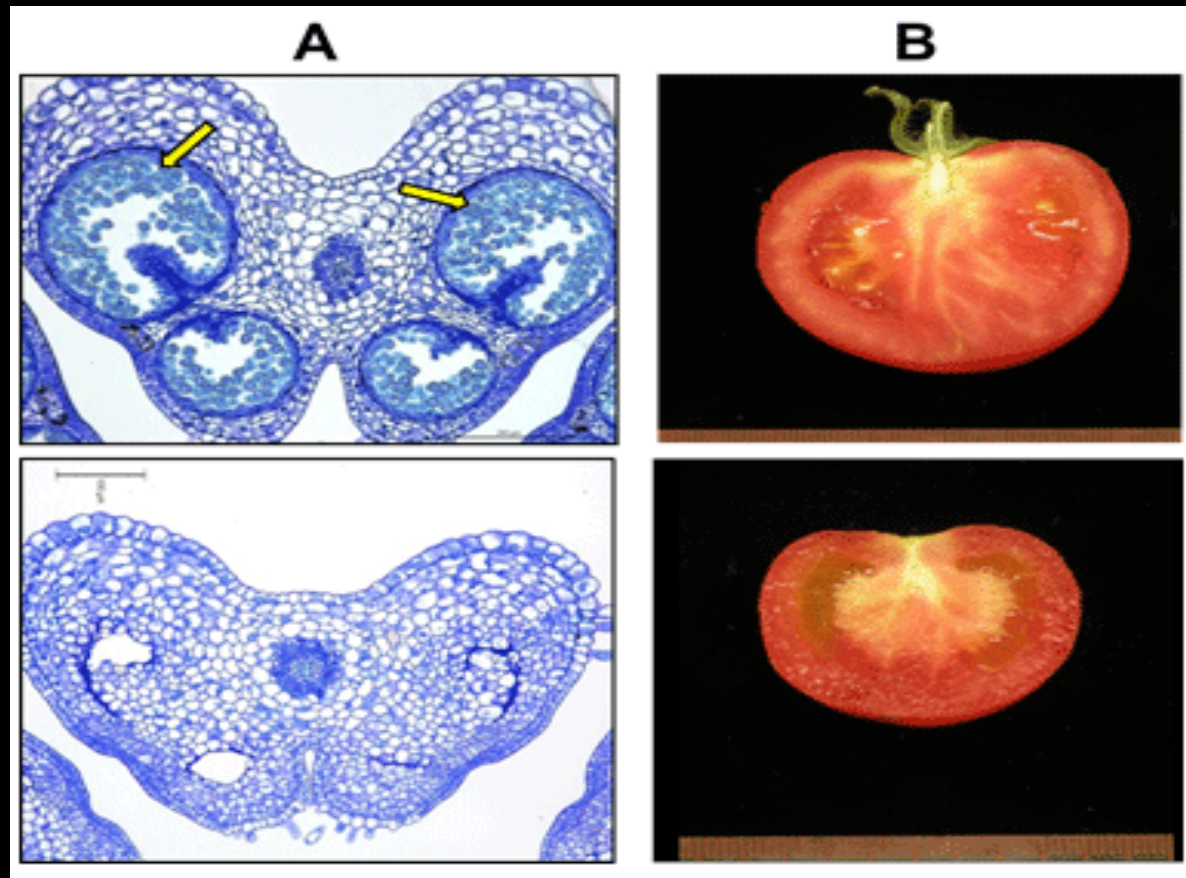
Traditional tomatoes showing the GF chocolate colour phenotype:



Chocolate lines «a la carte»:
GF1 CRISPR edited “Money Maker”



Obtenció de plantes de tomàquet sense pol·len amb la tecnologia CRISPR/Cas9: les plantes produeixen fruits sense llavors



La planta editada presenta la inserció d'un nucleòtid en la seqüència d'un gen necessari en el procés de formació del pol·len

Domesticació *de novo* del tomàquets silvestres editant a la vegada quatre gens mitjançant tecnologia CRISPR /Cas9

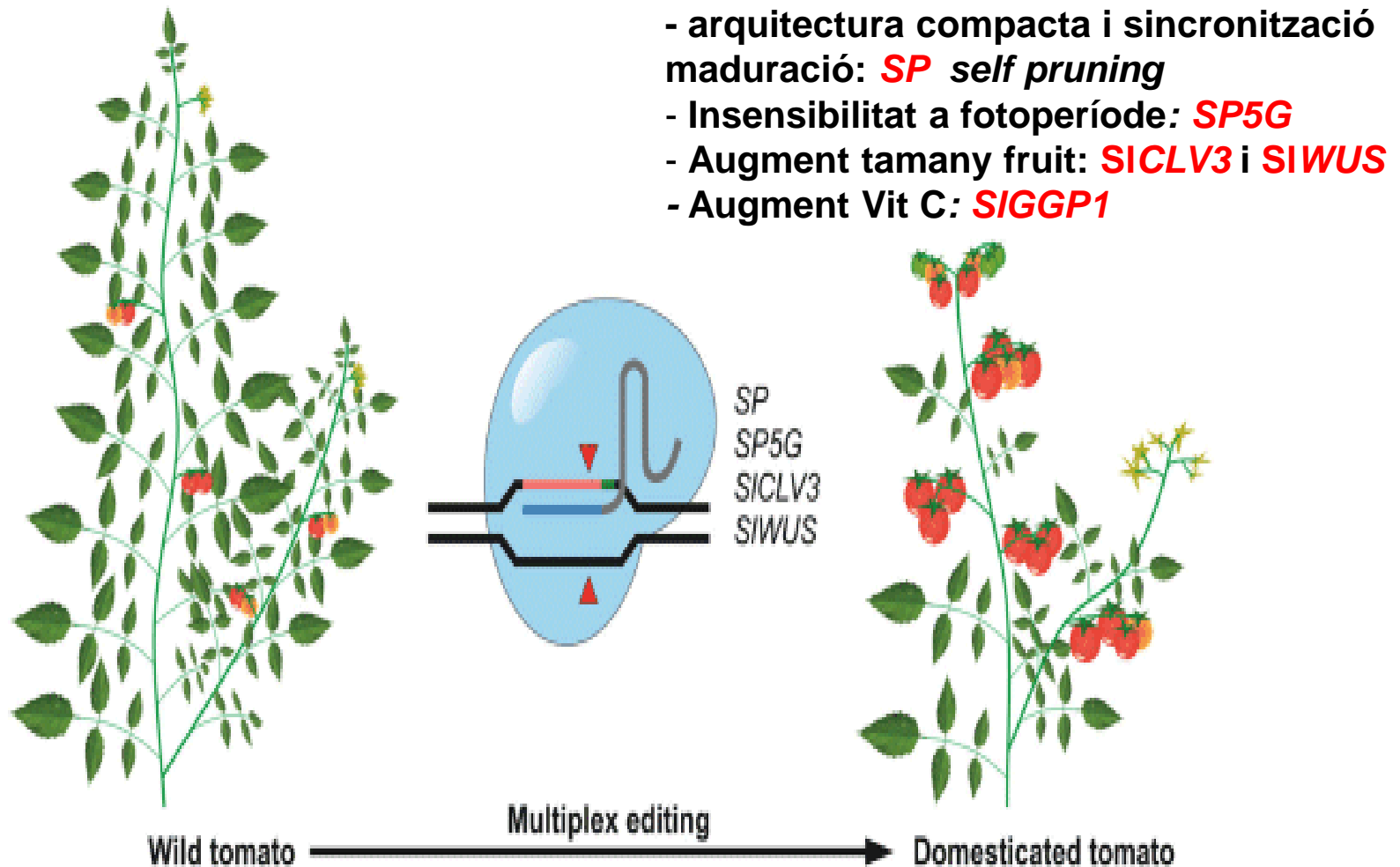


Fig. 2 De-novo domestication of tomato by CRISPR/Cas9-mediated multiplex editing. By simultaneously editing four genes involved in plant architecture (SP), flowering time (SP5G) and fruit size (SICLV3 and SIWUS), Li et al. [57] achieved accelerated domestication of wild tomato. Figure design according to Li et al. [57]

Li et al., 2018 Nature Biotechnology

CONCLUSIÓ

Gràcies als avenços en les **tècniques de seqüenciació i d'edició de genomes** podríem ser **optimistes** sobre un futur biotecnològic per aconseguir la seguretat alimentària.

Però per a que això sigui possible s'hauran de produir **canvis importants de caràcter socioeconòmic, regulador i ètic.**

Editorial CATARATA

¿QUÉ SABEMOS DE?

Cultivos transgénicos

José Pío Beltrán



 CSIC


CATARATA

**GRÀCIES per
la seua
atenció**

jbeltran@ibmcp.upv.es

