



Alianza



Summary of Tissue Culture Steps for Gene Editing *Brachiaria humidicola* 16888

Didier Marin & Paul Chavarriaga
The Gene Editing Platform

April/2023

La Alianza de Bioversity International y el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) hace parte de CGIAR, un consorcio mundial de investigación para un futuro sin hambre.

- Steps for Gene Editing *Brachiaria humidicola* 16888 from Mature Embryos



Whole mature seeds



Bleach-sterilized seeds



Naked seeds
(without carpiopsis)



Isolating whole embryo



Embryogenic Callus
Induction. At this stage
cells may be gene edited
with CRISPR-Cas9/Cpf1



De-novo regenerated gene-edited whole plants will grow on
selective media to isolate potential knock-out mutants

- Steps for Gene Editing *Brachiaria humidicola* 16888 from Immature Embryos



Donor Plants in Greenhouse



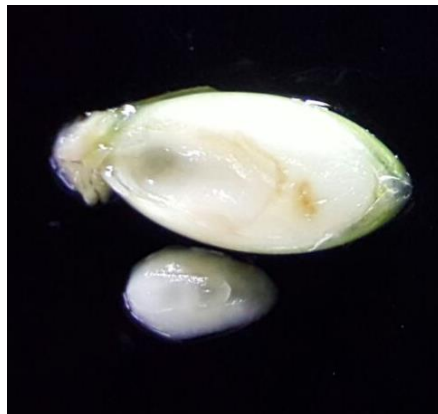
Pannicule at Anthesis



Immature seeds



Immature Endosperm



Isolated Immature Embryo (bottom)



Immature Embryogenic tissue dividing on inductive medium



Embryogenic tissues are gene-editable at this stage



De novo regenerated plants



Alianza



The Alliance's Gene Editing Platform

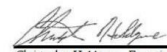
excellence  through
STEWARDSHIP

The GSG Executive Director certifies that
International Center for Tropical Agriculture
has successfully completed the Excellence Through Stewardship Audit
Requirements for its global operations

Audit Condition of
ETS Member in Good Standing
satisfied through 2025

Member Since 2017

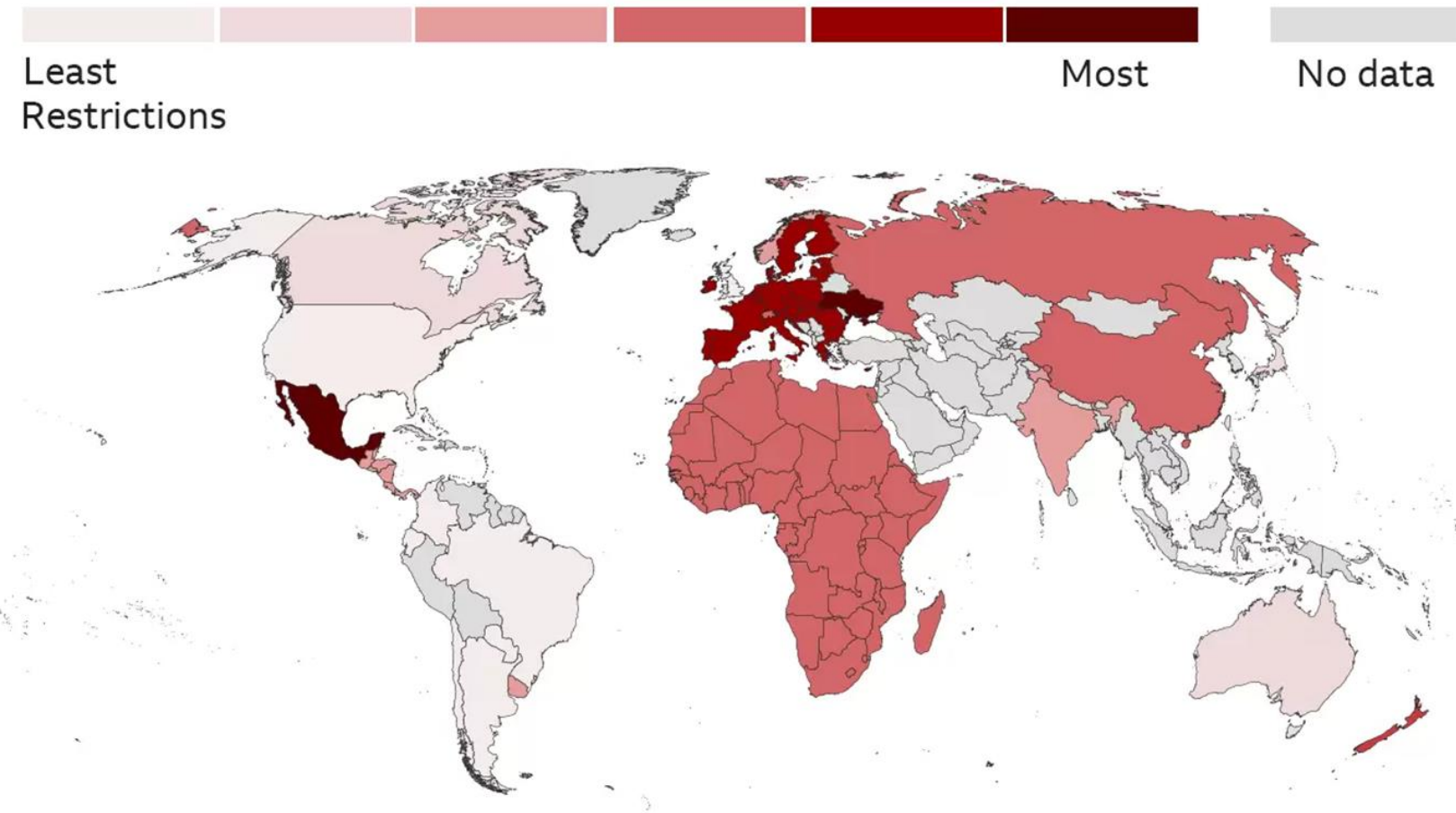



Christopher Holdgreve, Executive Director

Paul Chavarriaga, Sandra Valdés & Collaborators
April, 2023

La Alianza de Bioversity International y el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) hace parte de CGIAR, un consorcio mundial de investigación para un futuro sin hambre.

Restrictions on gene editing in food crops around the world



Source: Genetic Literacy Project

BBC

Alianza

Bioversity
International

CIAT
Centro Internacional de Agricultura Tropical
Desde 1957 Ciencia para cultivar el cambio

"Por la cual se establece el procedimiento para el trámite ante el ICA de solicitudes de un cultivar mejorado con técnicas de innovación en fitomejoramiento a través de Biotecnología moderna, con el fin de determinar si el cultivar corresponde a un Organismo Vivo Modificado o a un convencional".

EL GERENTE GENERAL

DEL INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA)

En uso de sus facultades legales y en especial de las conferidas por el artículo 65 de la ley 101 de 1993 y el artículo 4 del Decreto 3761 de 2009 y

CONSIDERANDO

Que de conformidad con el artículo 65 de la Ley 101 de 1993 "Ley General de Desarrollo Agropecuario y Pesquero" corresponde al Ministerio de Agricultura por intermedio del Instituto Colombiano Agropecuario ICA, desarrollar políticas y planes tendientes a la protección de la sanidad, la producción y la productividad agropecuaria del país. Por lo tanto, será el responsable de ejercer acciones de sanidad agropecuaria y el control técnico de las importaciones, exportaciones, manufactura, comercialización y uso de los insumos agropecuarios destinados a proteger la producción agropecuaria nacional y a minimizar los riesgos alimentarios, ambientales que provengan del empleo de los mismos y a facilitar el acceso de los productos nacionales al mercado internacional.

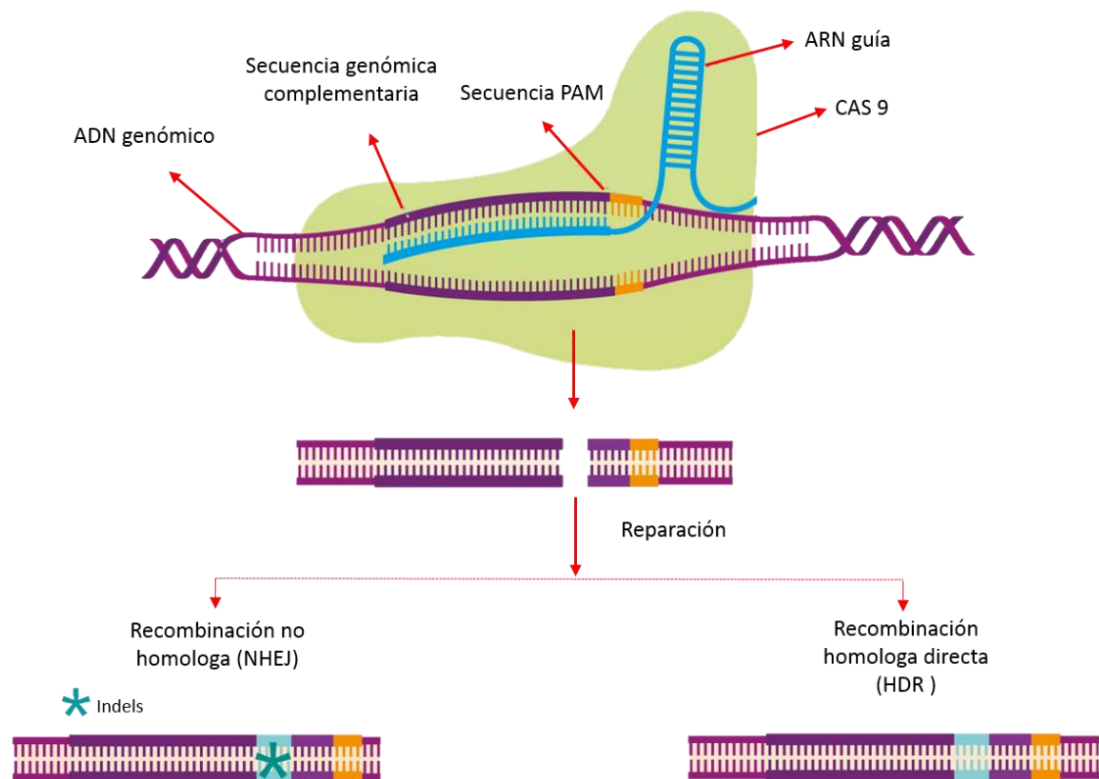
Que mediante Ley 740 de 2002 Colombia ratificó el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad en la Biotecnología del Convenio sobre Diversidad Biológica, el cual tiene como objetivo, de conformidad con el enfoque de precaución, contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización segura de los Organismos Vivos Modificados resultantes de la Biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos para la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica y centrándose concretamente en los movimientos transfronterizos.

Que en desarrollo de estas disposiciones, el gobierno nacional expidió el Decreto 4525 del 6 de diciembre de 2005 "Por el cual se reglamenta la Ley 740 de 2002", y estableció que el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, a través del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA será competente para la autorización de las actividades señaladas en

Colombian Regulation 2018



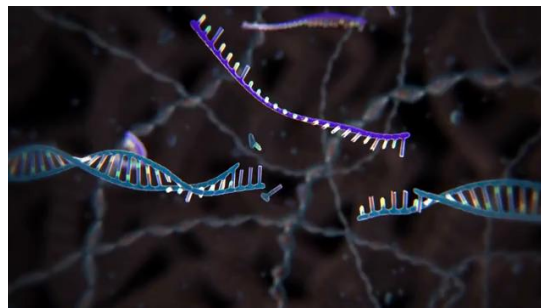
- ICA resolution #00029299: Regulatory framework.
- Gene Edited waxy maize and rice resistant to *Xam* are conventional lines
- New framework will include animals



New vareties

Proof of concept
Climate Change

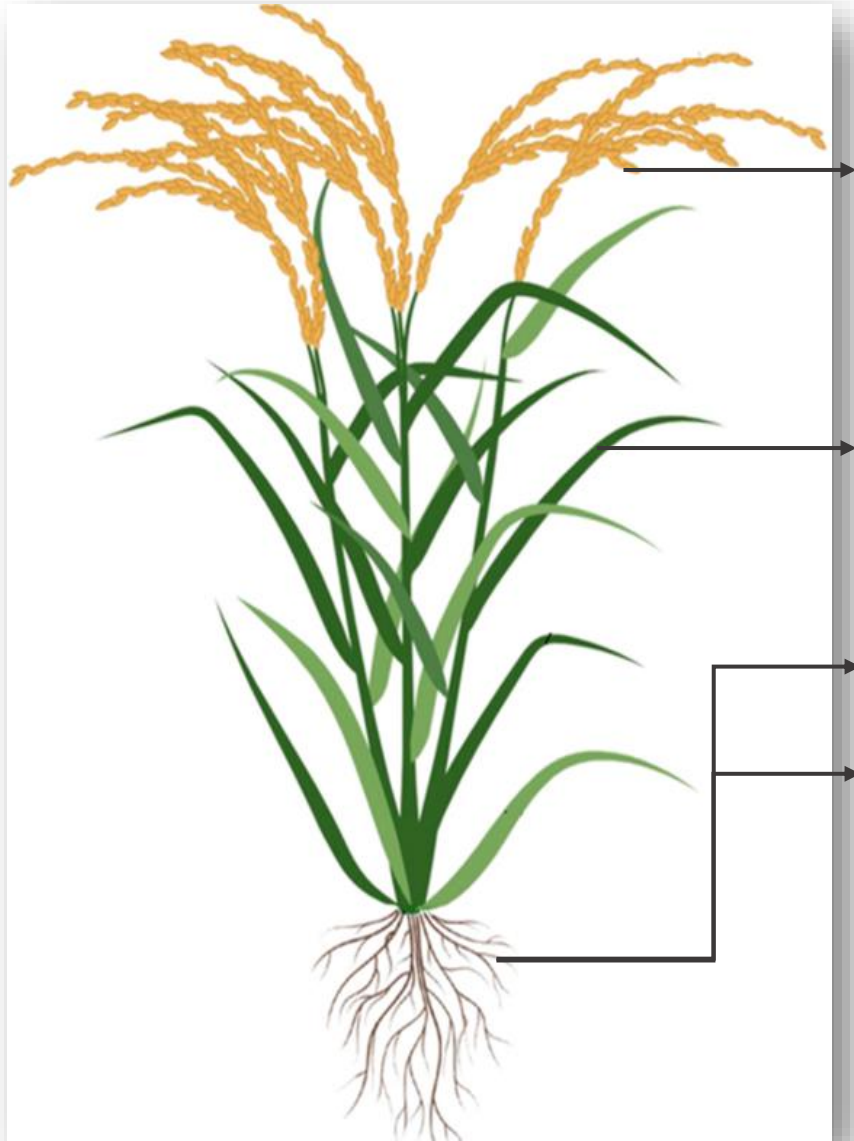
Gene Validation



Gene edited, *Xam*-Resistant rice is a CONVENTIONAL variety in Colombia



Bezos Earth Fund supports Gene Editing to make rice a more efficient Carbon storer



Trait	Gene	Phenotype	References
Yield	GN1A	-Increase the number of grains in the main panicle. -Increase plant height, panicle size and number of flowers per panicle	Frontiers Reassessment of the Four Yield-related Genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in Rice Using a CRISPR/Cas9 System (frontiersin.org)
Photosynthetic Efficiency	OsH XK1	High-photosynthetic efficiency and high yielding rice varieties	Improving the Rice Photosynthetic Efficiency and Yield by Editing <i>OsH XK1</i> via CRISPR/Cas9 System - ProQuest
Root Architecture	OsAUX1	Increase Primary Roots Length	https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1111/tbj.12929
Nitrogen Fixation	CYP75B3 and/or CYP75B4	Induce accumulation of flavones inside the plant and the exudation of these from the roots into the soil, where they activate the biofilm synthesis in the N2-fixing bacteria.	WO2022015762 PLANT METABOLITE-MEDIATED INDUCTION OF BIOFILM FORMATION IN SOIL BACTERIA TO INCREASE BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION AND PLANT NITROGEN ASSIMILATION (wipo.int)



Control
Llanura 11, Japonica

filled grains/plant: **1678**
Average of seven plants: 2399
Thousand grains weight: **27.9 g**
Total grain weight/plant: 50.2 g
of panicles: **16**



Edited line #13
(165.31.20.3)

filled grains/plant: **4552**
Average of seven plants: 3392.6
Thousand grains weight: **28.3 g**
Total grain weight/plant: 114.2 g
of panicles: **36**

Llanura11	CGGCATCAGCGGCCAGGCCTTCCGCCATGG	CCCGCCAGATTTC	CAACGTGCTAG	AGCTCG	73
165.31.20.3	CGGCATCAGCGGCCAGGCCTTCCGCCATGG	CCCCCA	--TTTCCAACGTGCTAG	AGCTCG	118
	*****		*****		



Reducing *Cd* (*OsNRAMP5*) & *Ar* (*Ls1*, *Ls2*, *Ospt8*) Absorption

- Biofortified lines (Colombia)
- High Yielders (Grain number)
- Uruguay (Arsenic)
- Bangladesh (Cadmium)

Gene Editing Cassava

Traits

Genes

Waxy Starch
>120 lines
Field Tested

GBSS1
(3 targets)

Herbicide
tolerance

Als
(2 targets)

Haploid inducers
Field Tested

NLD/pL1a/MTL
(2 genes 2 targets)

Xpm R⁺
>100 lines

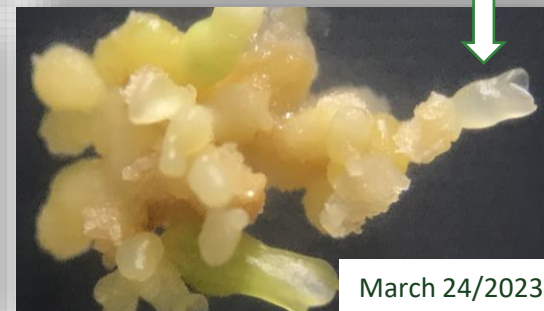
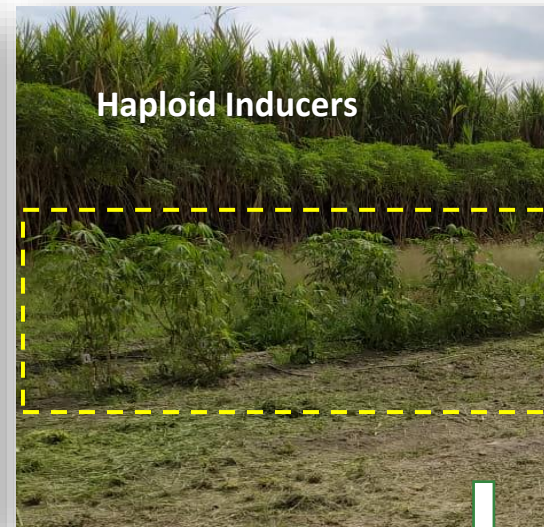
SWEET10a & 10b
(2 genes 4 targets)

SWEET10a_EBE2

```

Control      TCCGTTCCCTGGATTCTCCCTATATAAAAGCTTCTCGCCATTCATTCGACACATAGTAGTTTCCTCT WT
H-1(18)_all162 TCCGTTCCCTGGATTCTCCCTATATAAAAGCTTCTCGCC-----CAACATAGCTAGAGTTTCCTCT -14
H-3(20)_all11 TCCGTTCCCTGGATTCTCCCTATATAAAAGCTTCTCGGCCA-----CAACATAGCTAGAGTTTCCTCT -12
H-3(20)_all12 TCCGTTCCCTGGATTCTCCCTATATAAAAGCTTCTCGGCCATCCATTCGACACATAGTAGTTTCCTCT WT
H-4(21)_all11 TCCGTTCCCTGGATTCTCCCTATATAAAAGCTTCTCGGCCATCA-----ACATAGCTAGAGTTTCCTCT -10
H-4(21)_all12 TCCGTTCCCTGGATTCTCCCTATATAAAAGCTTCTCGGCCATCCATTCGACACATAGTAGTTTCCTCT WT
(22)_all162 TCCGTTCCCTGGATTCTCCCTATATAAAAGCTTCTCGGCCATCCATTCGACACATAGTAGTTTCCTCT +1
I-2(23)_all162 TCCGTTCCCTGGATTCTCCCTATATAAAAGCTTCTCGGCCATCCATTCGACACATAGTAGTTTCCTCT +1
I-2(24)_all162 TCCGTTCCCTGGATTCTCCCTATATAAAAGCTTCTCGGCCATCCATTCGACACATAGTAGTTTCCTCT +1
(29)_all162 TCCGTTCCCTGGATTCTCCCTATATAAAAGCTTCTCGGCCATCCATTCGACACATAGTAGTTTCCTCT +1
(32)_all162 TCCGTTCCCTGGATTCTCCCTATATAAAAGCTTCTCGGCCATCCATTCGACACATAGTAGTTTCCTCT +1
N-1(40)_all162 TCCGTTCCCTGGATTCTCCCTATATAAAAGCTTCTCGGCCATCC-----CAACATAGCTAGAGTTTCCTCT -56
    
```

Field Tests 2020 to 2023



Ingredion



Institut de Recherche
pour le Développement
FRANCE Éditions



UAN
UNIVERSIDAD
ANTONIO NARIÑO

Resistance to *Xpm*

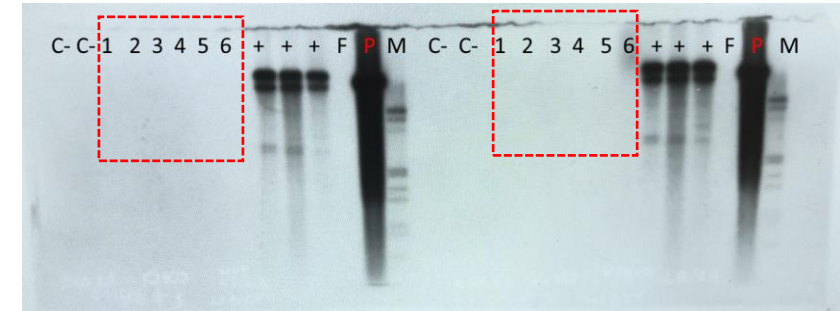
Alliance



TRANSGENE-Free Waxy Cassava Lines (pic. 12)



Waxy32-S1-P3 Waxy54-S1-P2 Waxy54-S1-P3 Waxy54-S1-P4 Waxy32-S1-P Waxy54 X Waxy8-P2

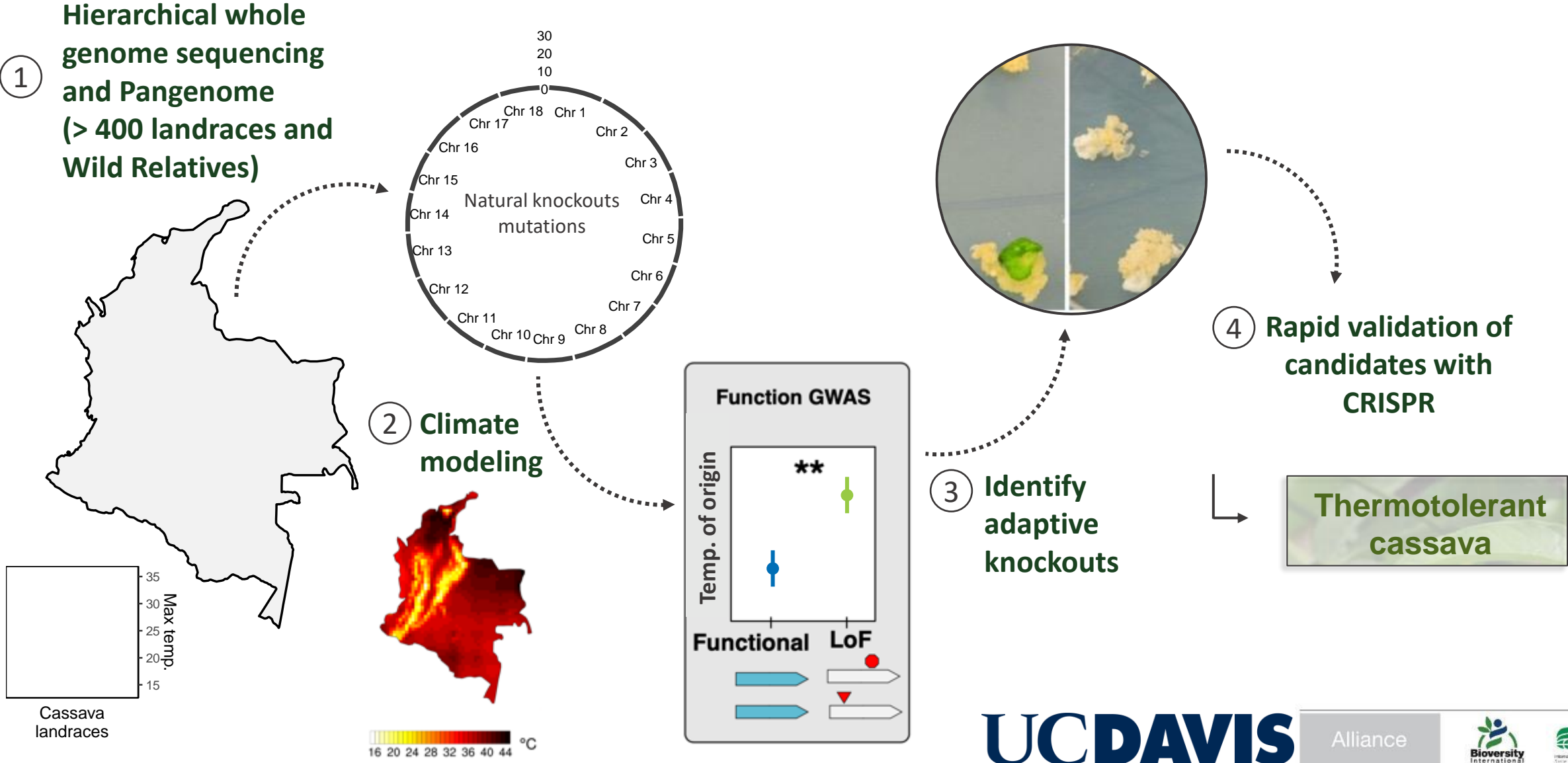


- 1) Waxy 54 x Waxy 8 (14-IX-21) # 2
- 2) Waxy 32 x Waxy 32-S1 (25-X-21): #2
- 3) Waxy 32 x Waxy 32-S1 (25-X-21): #3
- 4) Waxy # 54-S1 (23-IX-21): #2
- 5) Waxy # 54-S1 (23-IX-21): #3
- 6) Waxy # 54-S1 (23-IX-21): #4

- C-) Negative control TMS 60444
- F) Free
- P) PHSE 401
- M) Marker
- +) Waxy 4 #1
- +) Waxy 4 #2
- +) Waxy 4 #3

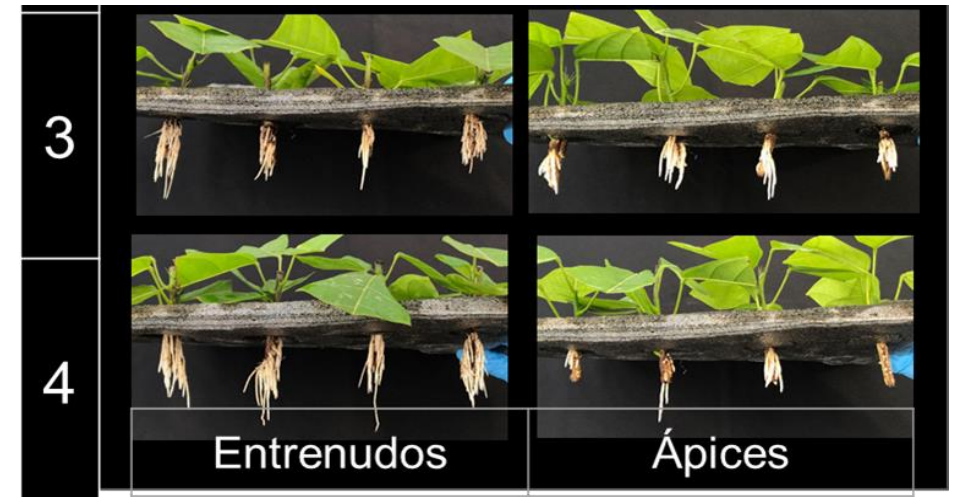
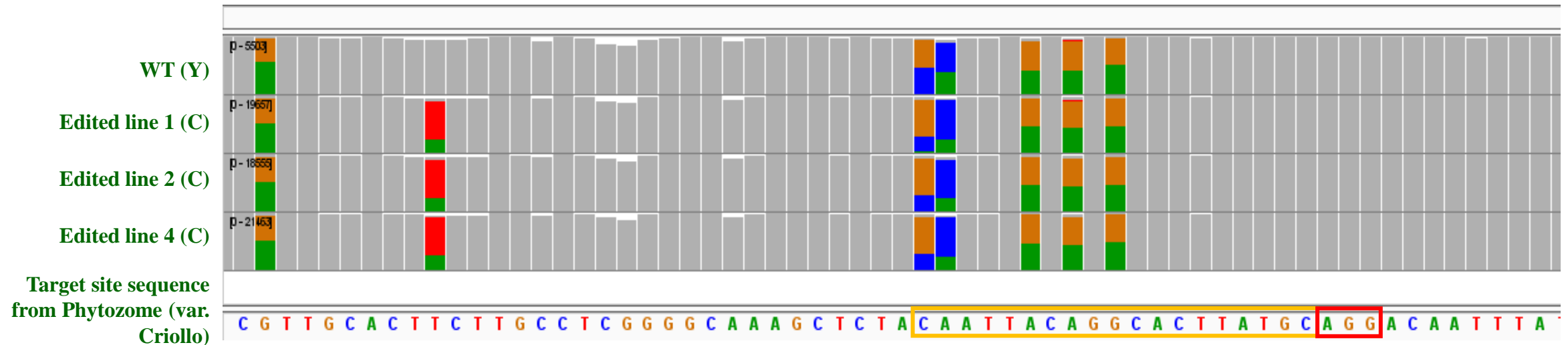
Selfings & Crosses made in Sep/Oct 2021; In Vitro since May 24/2022

Leverage landrace genomics to engineer thermotolerant cassava



Reducing Cd Absorbption in *Theobroma cacao*

Targeting the Gene *TcNRAMP5*



Acknowledgments:



The Gene Editing Team

Thanks!



M. Selvaraj
R. Escobar
G. Gallego
A. Gkanogiannis
H. Ceballos
X. Zhang
LA. Becerra
M. Lorieux
B. Szurek
P. Díaz-Tatis
MF. Alvarez
T. Tran
Grey Monroe et al
J. Tohme

Supporters:

RTB
USDA
CNCH
HHU/Gates Foundation
Ingredion
FLAR
UC-Davis/FFAR

(Left to right; Izquierda a Derecha)

Christian Valencia, Paul Chavarriaga, Anibal Penaloza, Maria Hernandez, Orlando Vacca, Arlen Mosquera, Natalia Franco, Gerardo Delgado, Francisco Sanchez, Didier Marín, Sandra Valdés, Jorge Flor.

Alianza

