

BV7. Edición de base del gen de la acetolactato sintasa de lechuga

Darqui, F. (1,2)*; Radonic, L. (1); Beracochea, V. (1); Hopp, E. (3,1); López Bilbao, M. (1).

(1) Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABiMo), Instituto de Biotecnología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Hurlingham, Argentina. (2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. (3) Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular (FBMC), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina. *darqui.flavia@inta.gob.ar

En distintas especies vegetales, mutaciones específicas en el gen de la acetolactato sintasa (ALS) conducen a sustituciones de aminoácidos que confieren resistencia a herbicidas. La sustitución espontánea de la prolina197 (Pro197) por histidina en el gen ALS de *L. serriola* (lechuga salvaje) generó resistencia a herbicidas de sulfonilureas e imidazolinonas, característica que se pudo transferir por cruzamiento a la lechuga cultivada (*L. sativa*). Además, en lechugas salvajes resistentes a herbicidas, también se detectó la sustitución espontánea de Pro197 por treonina, serina o leucina.

Nuestro objetivo es, mediante la edición de base mediada por CRISPR/Cas, reemplazar la Pro197 (CCC) del gen ALS de *L. sativa* (*LsALS*) por serina (TCC/TCT) o leucina (CTC/CTT) y obtener líneas de lechuga resistentes a herbicidas. Esto nos permitirá optimizar la metodología de edición génica y la selección de eventos resistentes a herbicidas en nuestro laboratorio.

El presente trabajo describe el ensamblado del vector de edición, su *delivery* por transformación genética y la evaluación de plantas T0 y T1.

Se identificó la región blanco en el gen *LsALS* mediante amplificación por PCR y secuenciación, verificando la ausencia de variantes alélicas. Para el ensamblado del vector de edición, se utilizó el plásmido pXSE901BG (Addgene), se reemplazó el *cassette* de selección que otorga resistencia a glifosato/glufosinato de amonio por otro de resistencia a kanamicina, y se incorporó la secuencia gRNA-espaciadora dirigida a *LsALS*-Pro197. Se transformaron 132 cotiledones de lechuga (var. Grand Rapids) *vía* *Agrobacterium tumefaciens*, obteniéndose 8 eventos de transformación (eficiencia de transformación del 6 %). De cada callo resistente a kanamicina, se obtuvieron 1 a 3 plantas T0. Para confirmar la transformación estable se extrajo el ADN genómico de hojas de plantas adultas y se amplificaron por PCR dos fragmentos del T-DNA: uno incluyendo el gen *NPTII* y otro incluyendo el ARN guía (gRNA), siendo este último confirmado por secuenciación. Las plantas transgénicas se auto-polinizaron y produjeron semillas T1. Se confirmó la transgénesis en la progenie T1 mediante la evaluación del

fenotipo de resistencia a kanamicina. Para la pre-selección de eventos de edición putativos, se ajustó un sistema de detección in vitro, germinando semillas T1 en medio de cultivo suplementado con el herbicida clorsulfurón. Una concentración de 50 mg/L de clorsulfurón inhibió el crecimiento de la raíz en plántulas control no transgénicas (NT), mientras que algunas plántulas T1 mostraron cierto grado de tolerancia, compatible con una edición exitosa en el gen *LsALS*. Estas plantas fueron trasplantadas a maceta y se encuentran actualmente bajo análisis de caracterización molecular para la detección de cambios C por T en la región blanco.