

OPTIMIZACIÓN DE LA TRANSFECCIÓN DE PROTOPLASTOS PARA LA EDICIÓN GÉNICA EN FRESA

Cristina SÁNCHEZ-RAYA¹, Gloria LÓPEZ-CASADO¹, Rosario BLANCO-PORTALES², Sara POSÉ¹, Fernando PLIEGO-ALFARO¹, Antonio J. MATAS¹, José A. MERCADO¹

¹Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” IHSM-UMA-CSIC; Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, Universidad de Málaga, Spain.

csanray@uma.es, glorialcasado@gmail.com, sarapose@uma.es, antoniojmatas@uma.es, mercado@uma.es.

² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, Spain.

Bb2blpor@uco.es

La fresa es un fruto blando de gran importancia económica, particularmente en Andalucía. La mejora de las cualidades organolépticas del fruto y la disminución del reblandecimiento para alargar la vida postcosecha del fruto, son unos de los principales objetivos de los programas de mejora en este cultivo. El reblandecimiento del fruto es consecuencia del desmantelamiento de la pared celular, la disolución de la lámina media y la pérdida de turgencia. En fresa, el silenciamiento mediante la transformación en antisentido de genes que codifican poligalacturonasas (PG) aumenta la firmeza del fruto y la vida postcosecha (Paniagua *et al.*, 2020). Por tanto, estos genes son excelentes dianas para la edición génica con el fin de mejorar la calidad del fruto de la fresa. La transfección de protoplastos con complejos preensamblados Cas9-sgRNA permite la producción de plantas editadas vía CRISPR/Cas9 libres de ADN foráneo, que podrían ser consideradas como no transgénicas. En esta investigación, se ha optimizado un protocolo para la transfección de protoplastos de fresa, con el objetivo final de producir plantas no transgénicas con el gen de poligalacturonasa *FaPG1* mutado. Como fuente de material vegetal se utilizaron hojas de plantas de *Fragaria x ananassa*, cv. ‘Chandler’, micropropagadas en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con 2 mg/L de BA. Para la extracción de protoplastos se utilizó el protocolo descrito por Barceló *et al.* (2019). A las 24 h del aislamiento, los protoplastos fueron transfectados con el plásmido pHBT-sGFP(S65T)-NOS que contiene el gen marcador GFP, mediante un tratamiento con polietilenglicol (PEG), como se describe en Yoo *et al.* (2007). Se evaluaron, entre otras variables, el efecto de la concentración y tiempo de incubación en PEG y la concentración de ADN. Los valores más altos de protoplastos con actividad GFP a las 48 h de la transfección, entre el 15-18%, se obtuvieron tras la incubación en 20% de PEG en presencia de 5 µg de ADN. Este protocolo se está utilizando actualmente para la transfección de protoplastos de fresa con el sistema CRISPR/Cas9 para editar el gen *FaPG1*.

Esta investigación ha sido financiada por los fondos FEDER EU, el Ministerio de Economía y Competitividad de España (AGL2017-86531-C2-1-R), y el contrato FPI PRE2018-085509.

Transformación genética, Agrobiotecnología.

Referencias:

Barceló *et al.* (2019). Isolation and culture of strawberry protoplasts and field evaluation of regenerated plants. *Scientia Horticulturae* 256, 108552.

Paniagua *et al.* (2020). Elucidating the role of polygalacturonase genes in strawberry fruit softening. *Journal of Experimental Botany* 71, 7103–7117.

Yoo *et al.* (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* 2, 1565–1572

