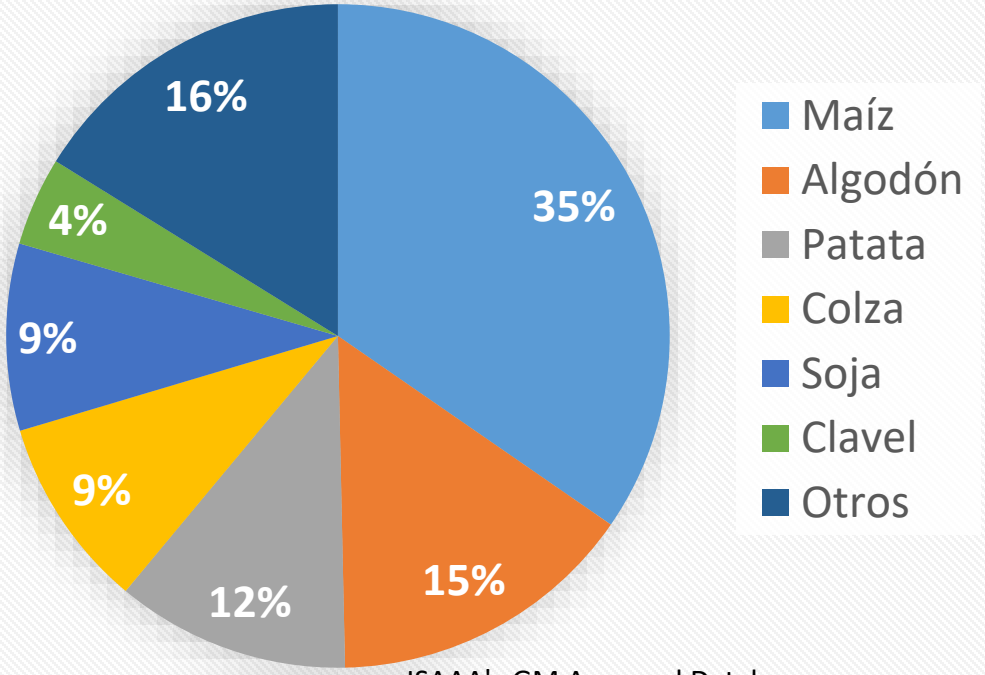
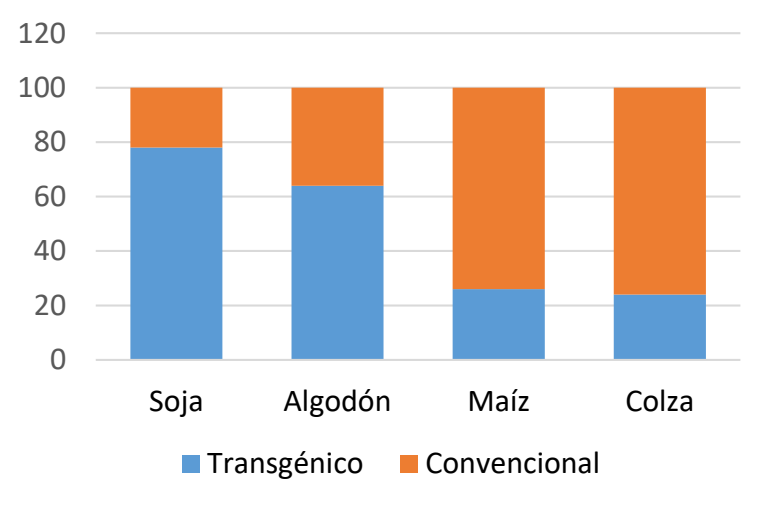
Aplicaciones de la biotecnología vegetal para la mejora de especies hortofrutícolas: dos casos de estudio, fresa y olivo

José Ángel Mercado Carmona
IHSM La Mayora, CSIC-UMA
Dpto. Fruticultura (IHSM)
Dpto. Botánica y Fisiología Vegetal (UMA)

En la actualidad, en diferentes partes del mundo se han aprobado un total de 439 eventos transgénicos en 32 especies



ISAAA's GM Approval Database.
https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/



Solo 26 eventos (5.6 %) corresponden a frutos (tomate, melón, manzano, papaya, piña, berenjena, calabaza, pimiento)

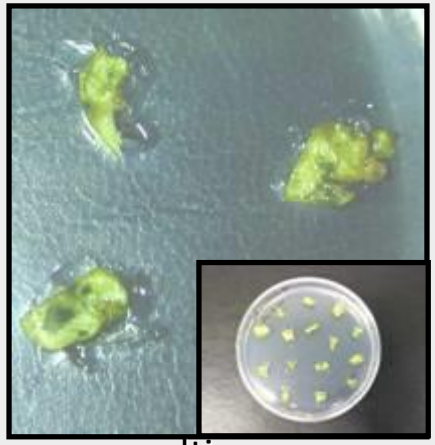
La transformación genética tiene importantes limitaciones:

- La aceptación social de los OMGs es muy baja
- La legislación de OMGs en la UE es muy restrictiva: solo se han aprobado para su cultivo 2 eventos transgénicos (maíz MON810, patata Amflora)

- Cisgénesis: Transformación con genes nativos completos
- Intragénesis: Transformación con secuencias génicas nativas (secuencia codificante, promotor, terminador)

- Edición génica: una planta editada es equivalente a una planta obtenida por técnicas de mutagénesis convencional o aparecida por mutación natural.
- En la UE, las plantas editadas son consideradas OMGs y se rigen por la misma legislación que las plantas transgénicas

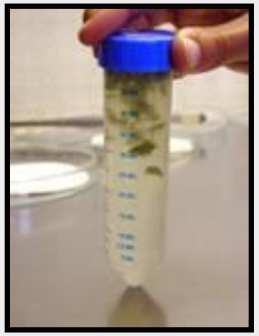
Transformación genética de fresa

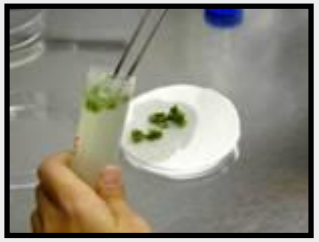


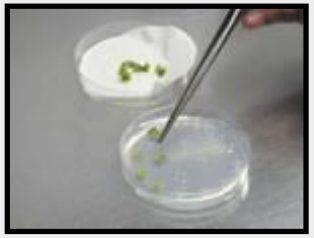
Aislamiento de explantos y precultivo

Agrobacterium tumefaciens

Infección





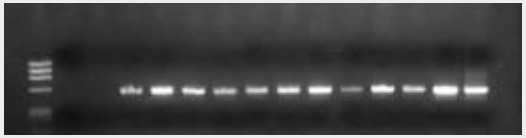


Cocultivo

Regeneración en medio selectivo (4-8 meses)

Aislamiento de tallos (6-12 meses)

Aclimatación



Análisis por PCR

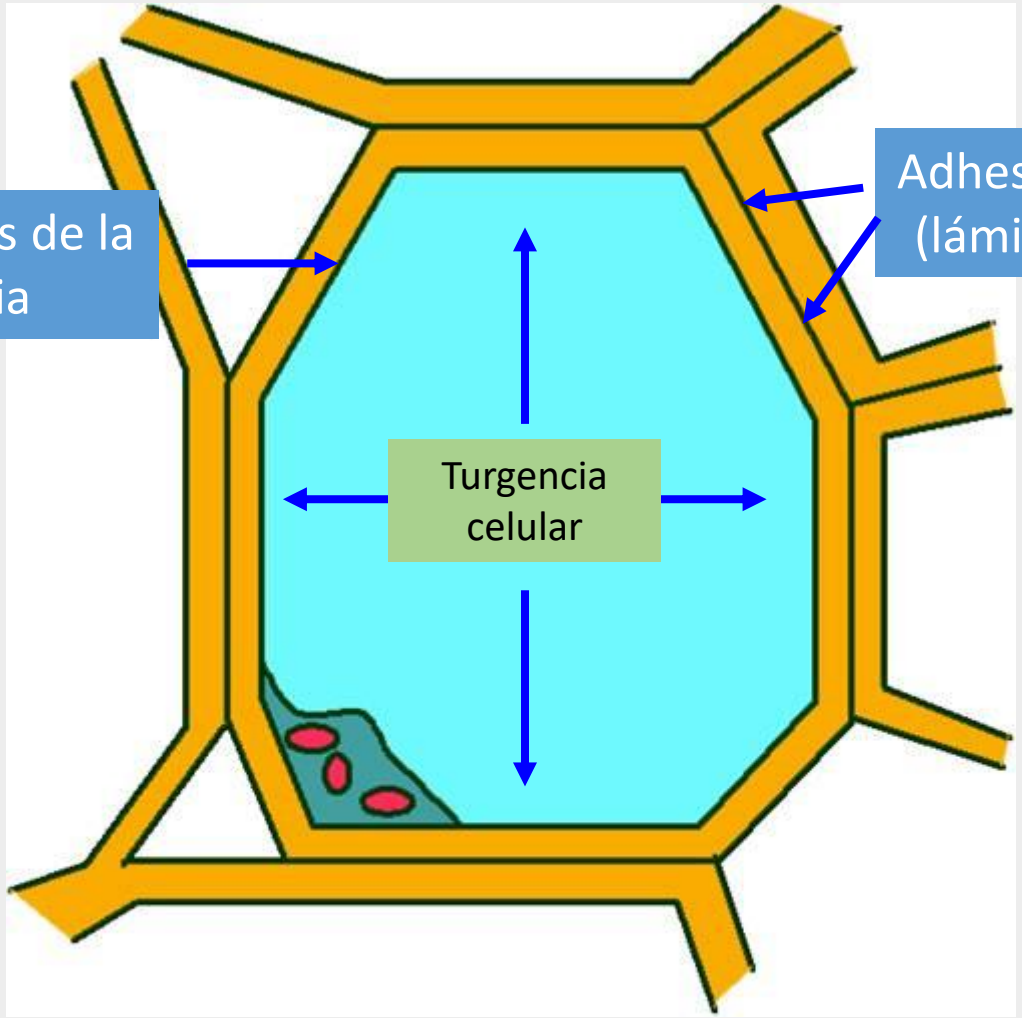
Multiplicación vegetativa

Análisis en invernadero

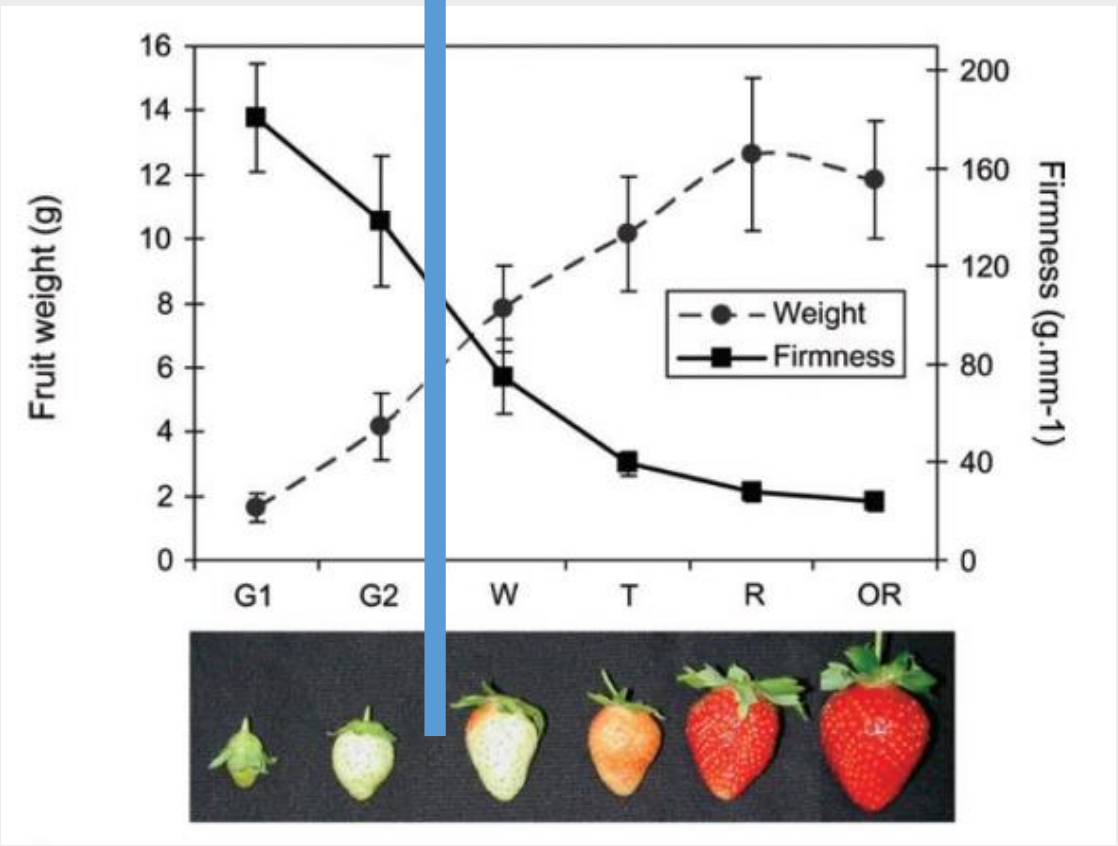
¿Qué soluciones puede aportar la transformación genética a la mejora de la fresa?

- Reducir el reblandecimiento y alargar la vida postcosecha del fruto
- Control de la maduración del fruto mediante manipulación de factores de transcripción reguladores del proceso
- Incrementar la tolerancia a patógenos fúngicos
- Calidad del fruto en un contexto de cambio climático

Reducir el reblandecimiento y alargar la vida postcosecha



Durante la maduración se desmantela la pared celular y disminuye la adhesión entre células. El fruto se reblandece



Expresión de genes que codifican enzimas y proteínas de pared celular:

- Poligalacturonasas
- Pectato liasas
- Pectin metil esterasas
- Pectin acetil esterasas
- β-Galactosidasas
- RGLiasas
- α-Arabinofuranosidasas
- β-Xilosidasas
- Glucanasas
- Expansinas
- Xiloglucan endo-transglicosidasas/hidrolasas

Silenciamiento de genes que codifican enzimas de pared celular

Gen	Firmeza
Poligalacturonasa (*FaPG1*)	+++++
Pectato liasa (*FaplC*)	++++
β-Galactosidasa (*FaβGal4*)	++++
Poligalacturonasa (*FaPG2*)	+++
RG liasa (*FaRGLyase1*)	+++
Pectin acetil esterasa (*FaPAE*)	++
Endo-β-(1,4)-glucanasa (*FaCel3*)	-
Expansina (*FaExp2*)	-
Cinamil alcohol deshidrogenasa (*FaCad1*)	-

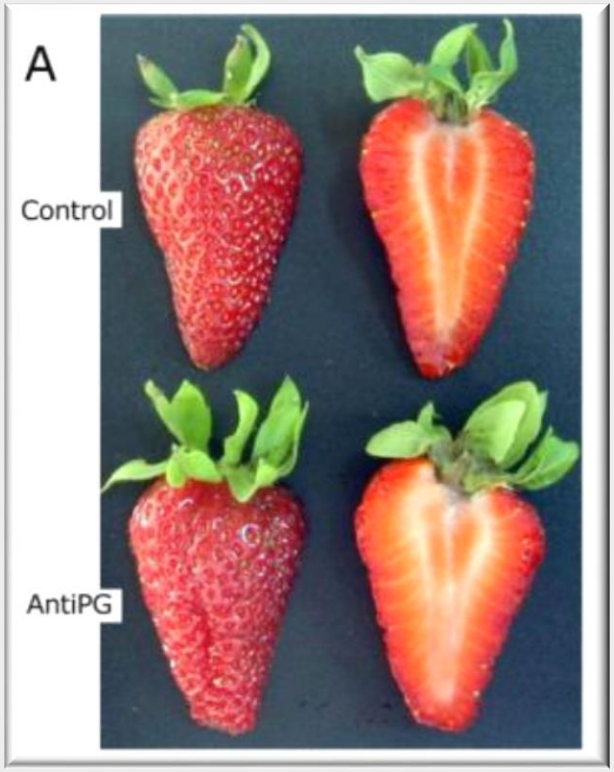
(-) sin efecto, (+) mayor firmeza que el control sin transformar

Control

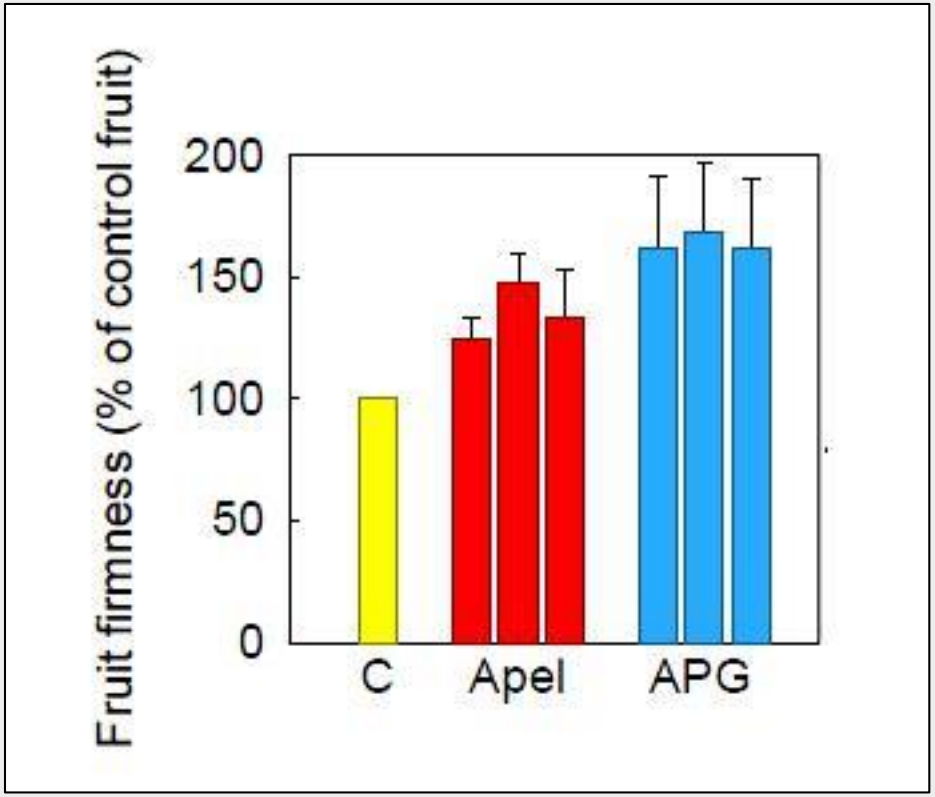
***FaplC* silenciado**

***FaPG1* silenciado**

El silenciamiento de los genes *FaplC* (líneas Apel) y *FaPG1* (APG) incrementa la firmeza del fruto maduro

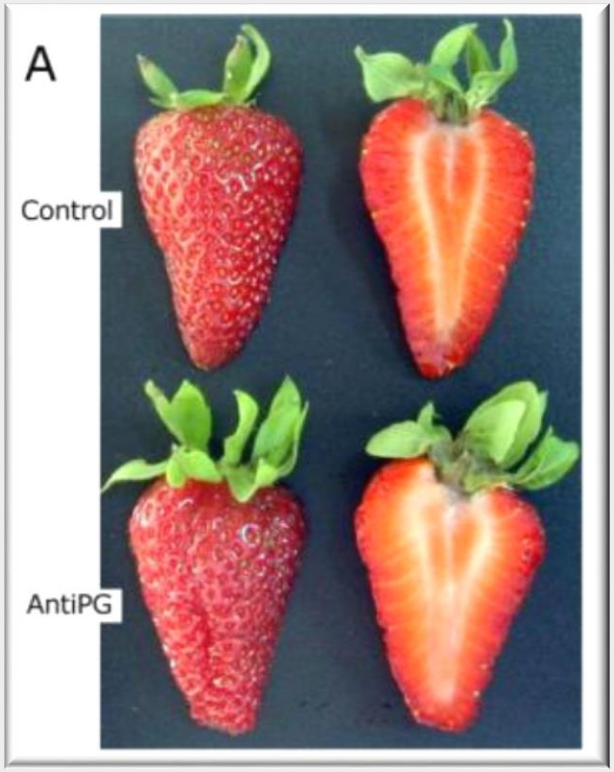


Firmeza de frutos maduros



Cada barra representa un línea transgénica independiente con más de un 95% de silenciamiento del gen

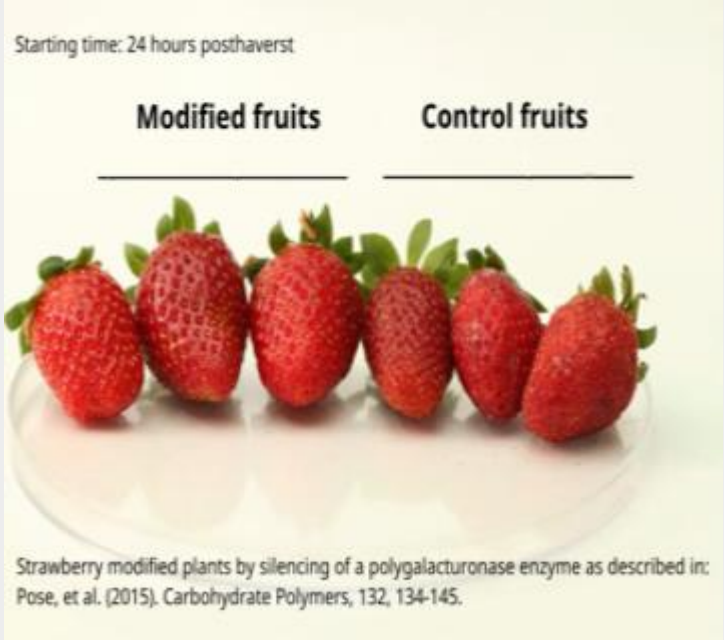
El silenciamiento de los genes *FaplC* (líneas Apel) y *FaPG1* (APG) no modifica otros atributos de calidad del fruto



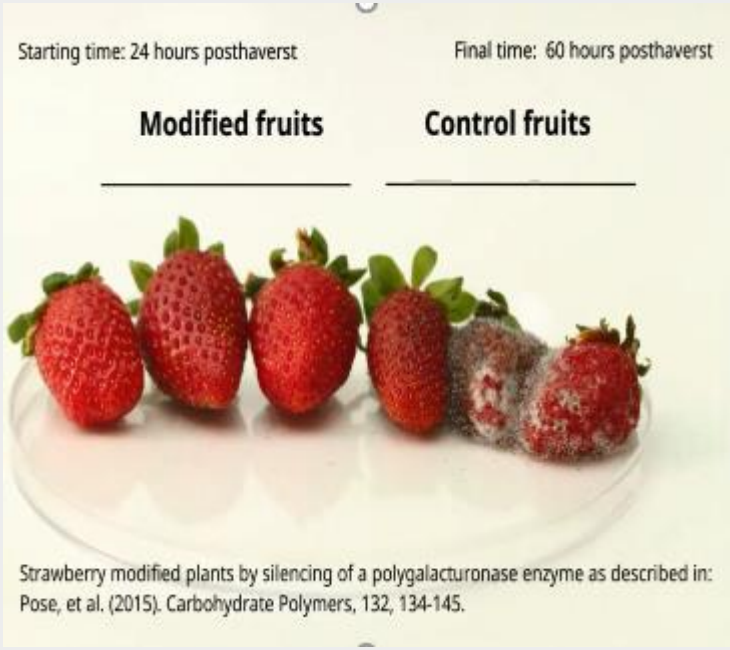
Parámetros de calidad del fruto

	Control	Apel	APG
Color			
L	37.3	39.9	35.7
a	37.4	40.1	36.5
b	20.2	25.2	19.2
pH	3.4	3.5	3.5
Sólidos solubles	7.7	7.8	7.9
Acidez titulable	6.2	5.5	6.3

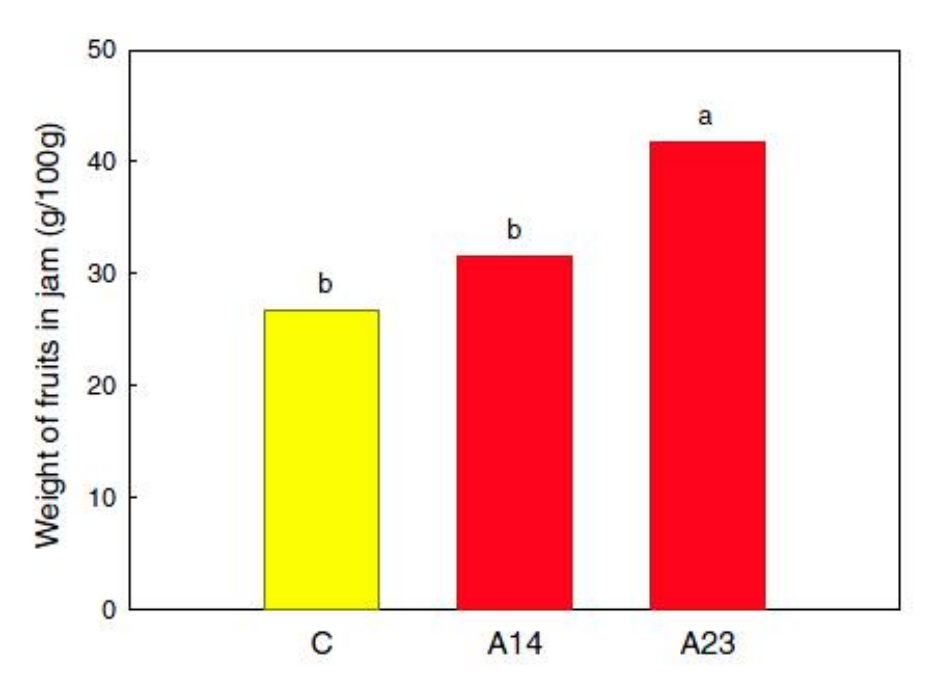
El silenciamiento de los genes *FaplC* (líneas Apel) y *FaPG1* (APG) alarga la vida postcosecha



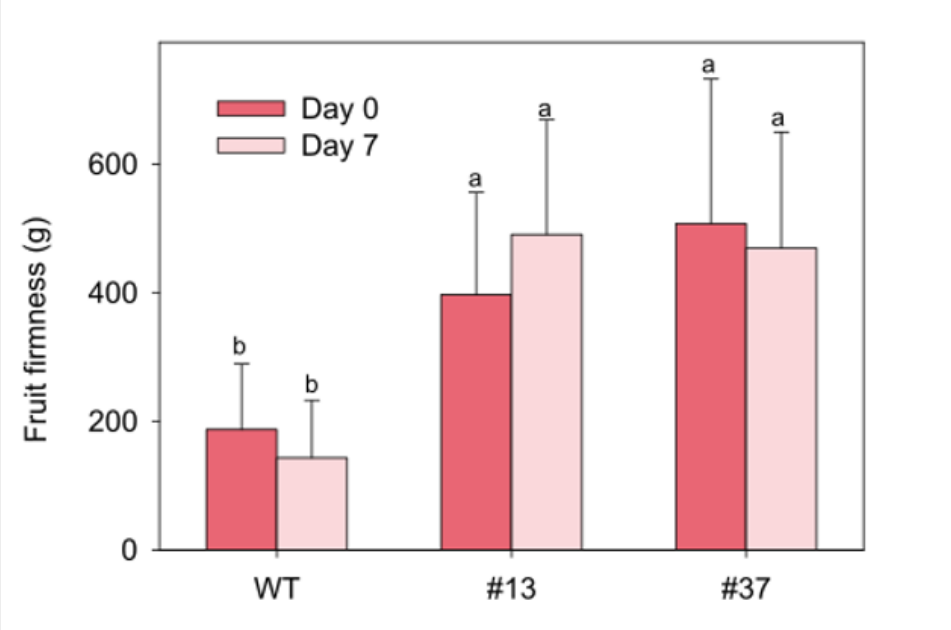
60 h a 25ºC



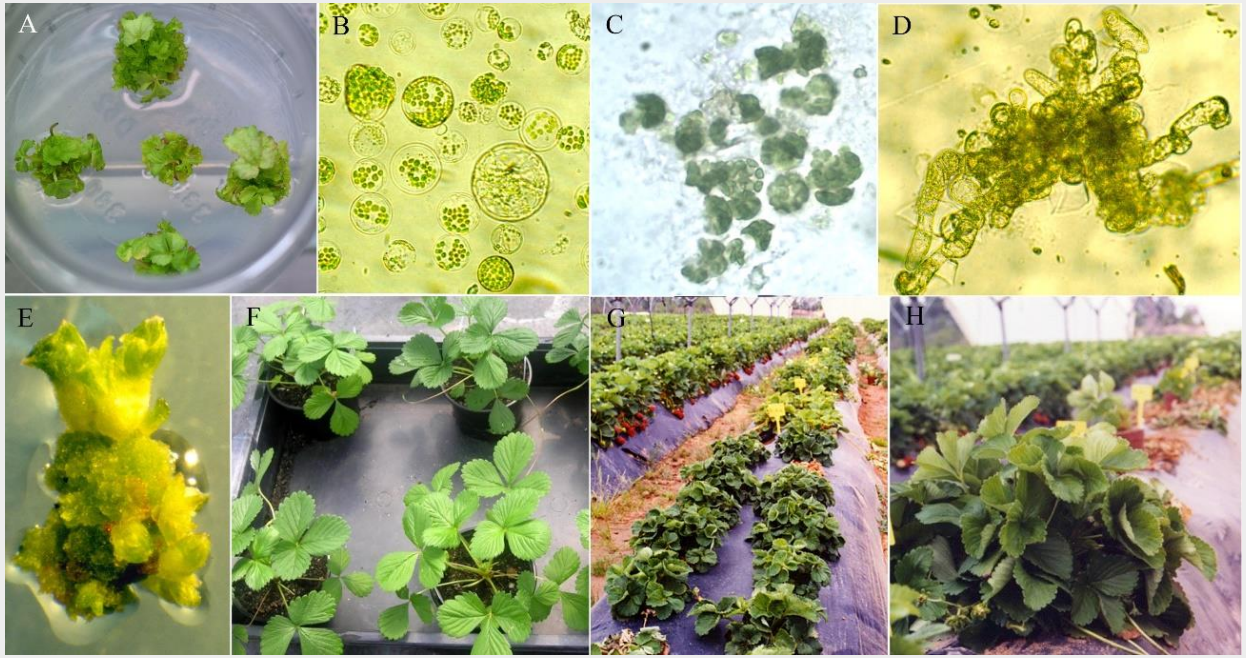
El silenciamiento de estos genes tiene aplicaciones en la industria de procesados de fruto

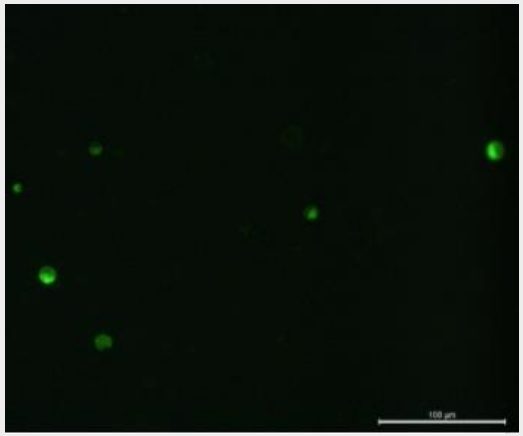


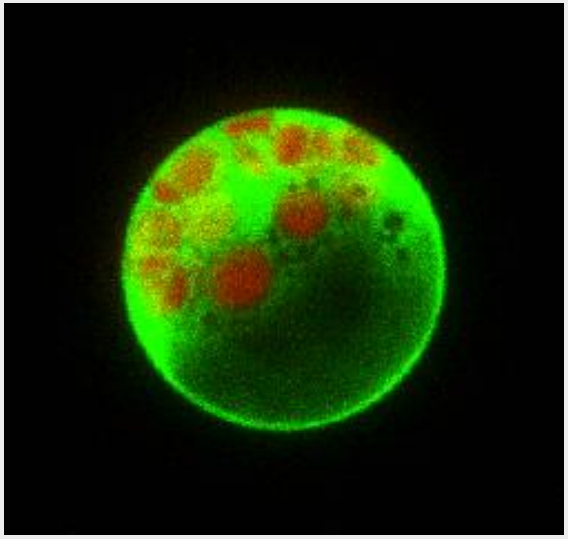
La edición del gen de poligalacturonasa *FaPG1* mediante CRISP/Cas9 tiene un mayor efecto en la reducción del reblandecimiento y mejora de la vida postcosecha



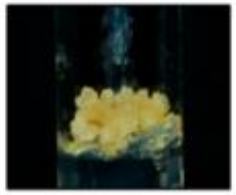
Editar el genoma de la fresa sin introducir transgenes: transfección de protoplastos con ribonucleoproteína Cas9/sgRNA



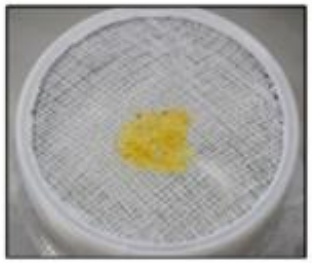




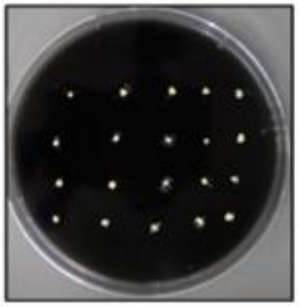
Transformación genética de olivo



Embryogenic callus culture



SE synchronization through culture into liquid ECO medium and filtration
4 weeks

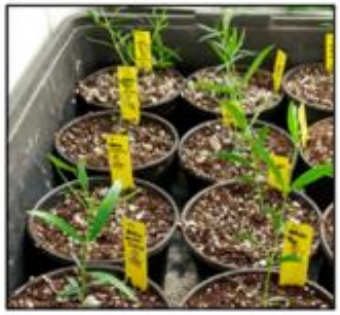


Culture of isolated SE on ECO medium + 1 g/L AC
4 weeks

Culture of SE on cellulose acetate membranes onto ECO medium + 1 g/L AC
4 weeks

Germination of SE in 1/3 MS
4 weeks

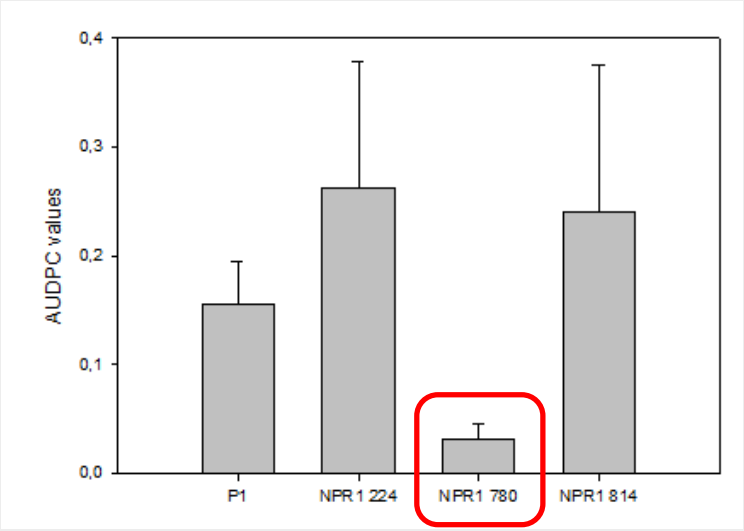
Acclimatized plants



¿Qué soluciones puede aportar la transformación genética a la mejora del olivo?

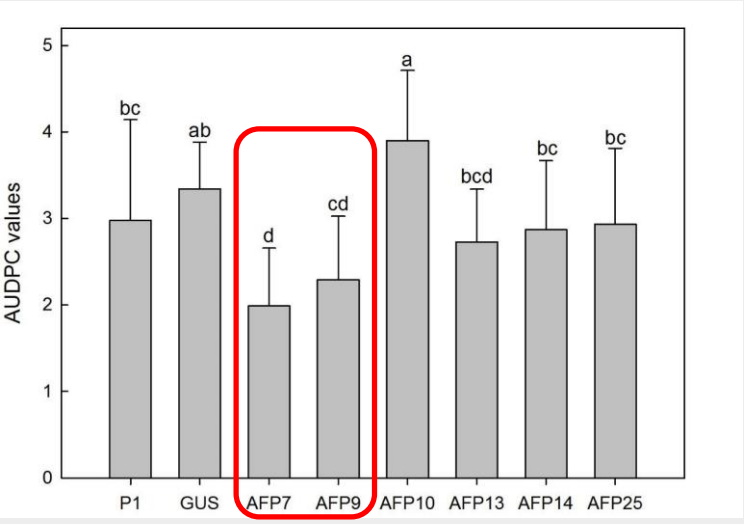
- Incrementar la tolerancia a patógenos fúngicos (Verticilosis)
- Modificar la calidad del fruto (y del aceite de oliva)
- Acortar el periodo juvenil. Inducción floral

Sobreexpresión del gen *NPR1* de *Arabidopsis thaliana*



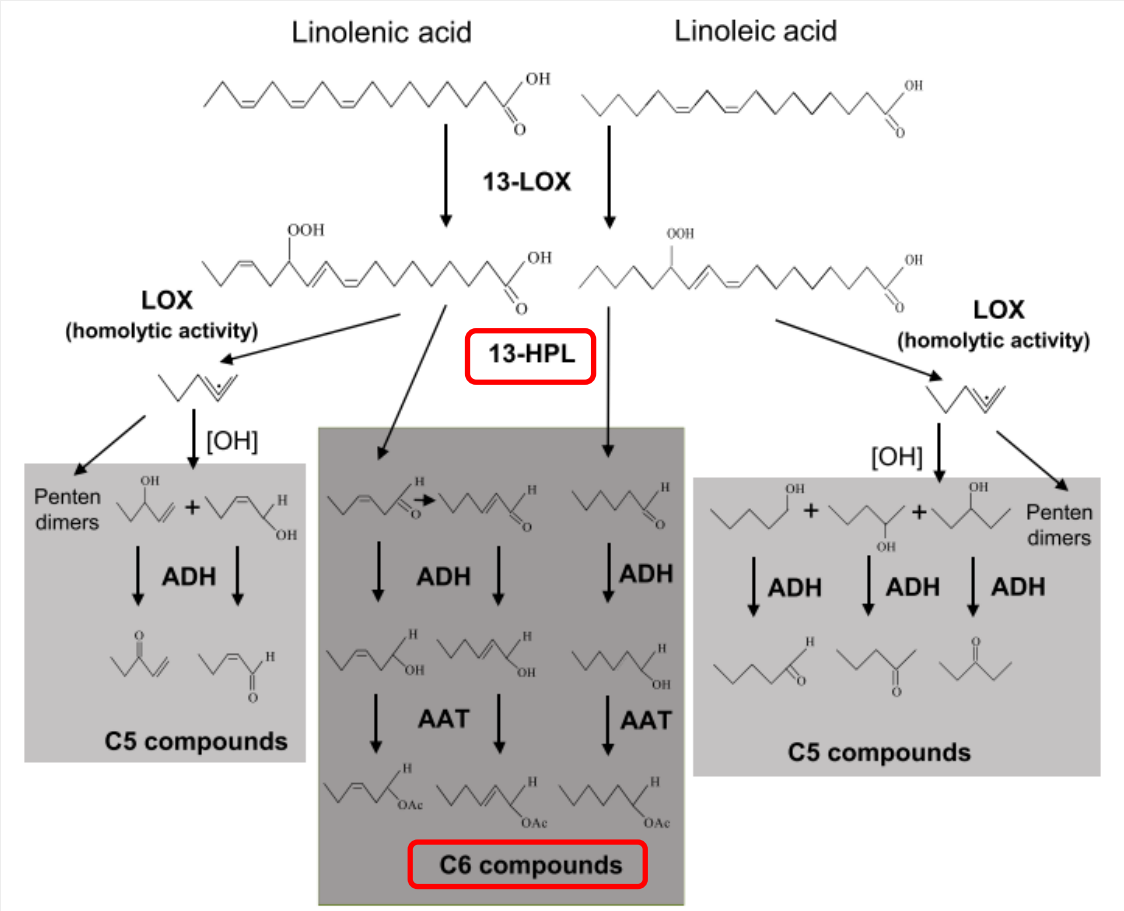
Ensayos de infección con *Verticillium dahliae*

Sobreexpresión del gen antifúngico *AFP* de *Aspergillus giganteus*



Ensayos de infección con *Rosellinia necatrix*

Modificación de la composición de compuestos volátiles en el aceite de oliva

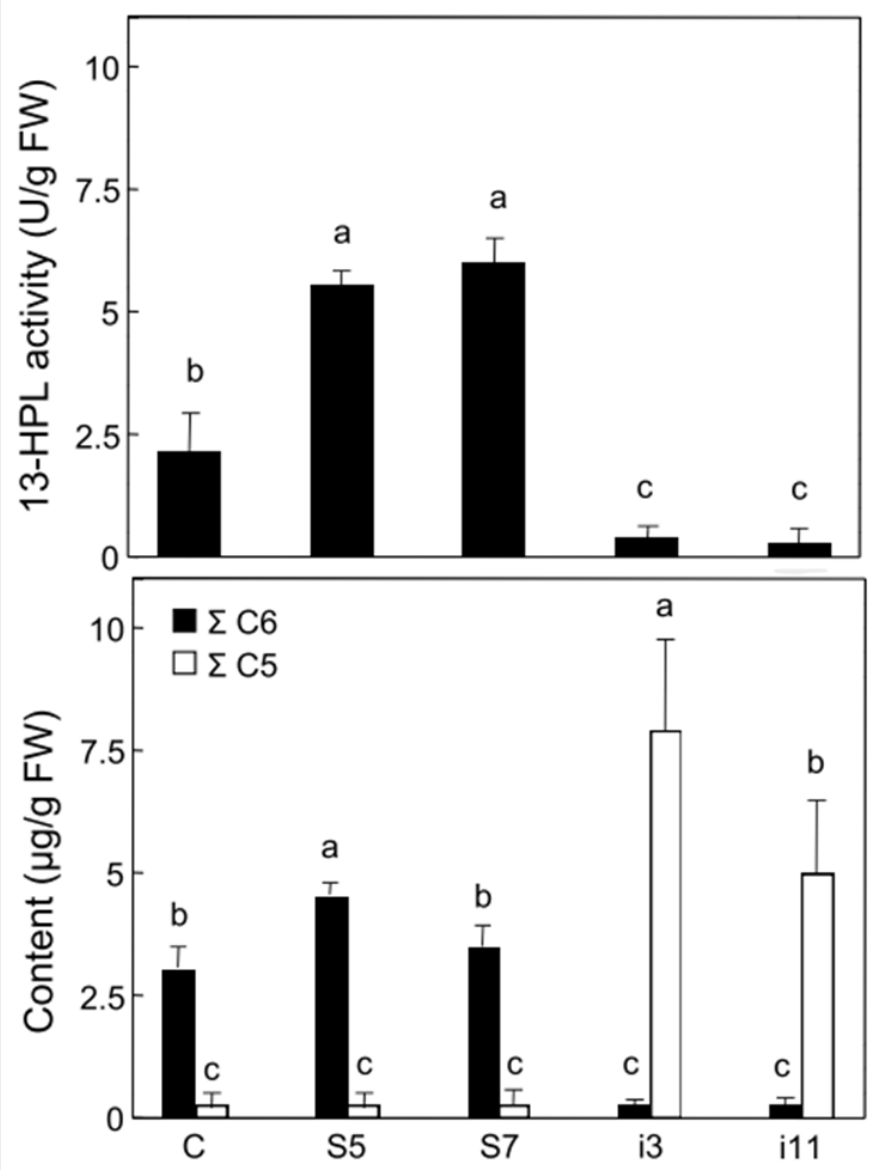


Green leaf volatiles

S7: línea que sobreexpresa HPL
i11: línea con HPL silenciado

- La sobreexpresión de HPL incrementa la ratio volátiles C6:C5 en hoja
- El silencimiento de HPL reduce la ratio volátiles C6:C5 en hoja

Posibilidad de obtener plantas que produzcan aceite de oliva con aromas a la carta



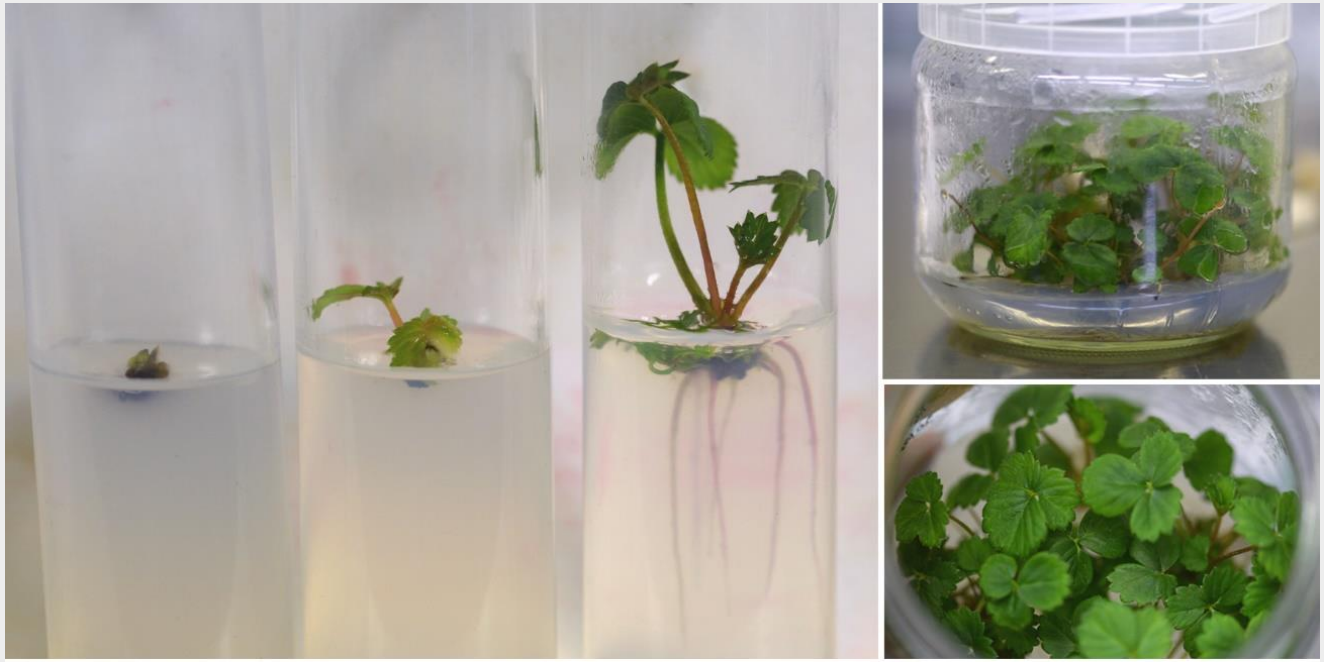
Acortamiento del periodo juvenil. Inducción floral

La sobreexpresión del gen FT de *Medicago truncatula* modifica el patrón de crecimiento de la planta e induce floración temprana

- Acortar el periodo entre cruzamientos en programas de mejora
- Favorecer la producción en condiciones climáticas no inductivas

Las técnicas de cultivo in vitro ofrecen otras alternativas a la producción de plantas transgénicas

Inducción de variabilidad genética en líneas de mejora mediante mutagénesis química con EMS

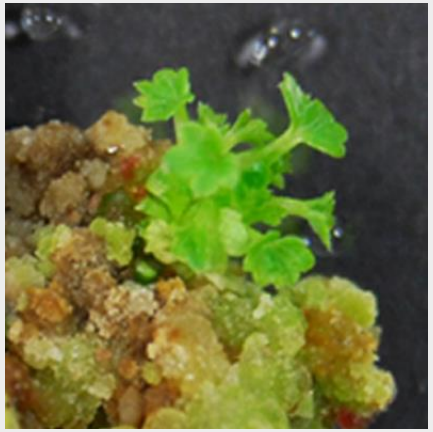


Introducción in vitro del material vegetal mediante cultivo de meristemos de estolones

Puesta a punto de un sistema de regeneración adventicia

Las técnicas de cultivo in vitro ofrecen otras alternativas a la producción de plantas transgénicas

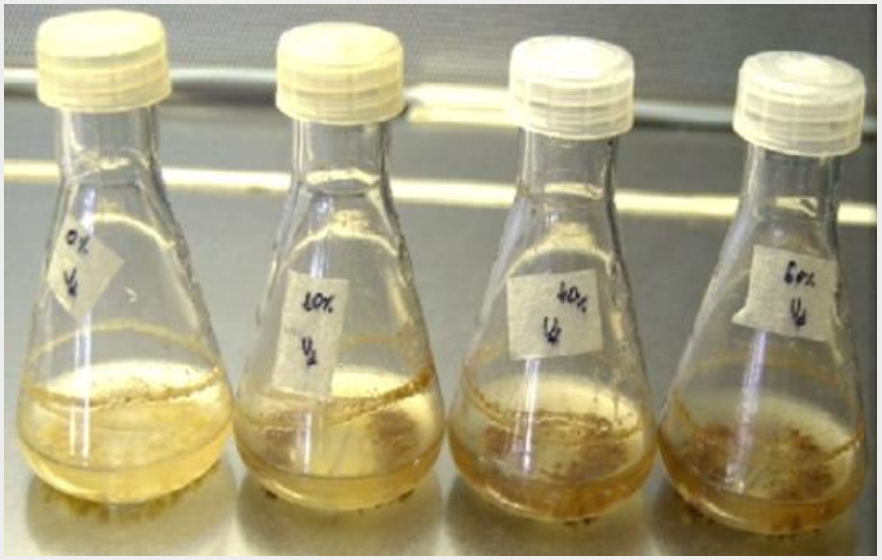
Inducción de variabilidad genética en líneas de mejora mediante mutagénesis química con EMS

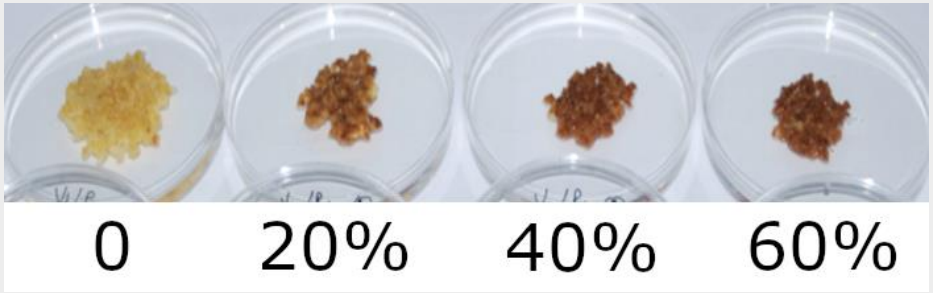


Tratamiento de los explantos con EMS y regeneración in vitro

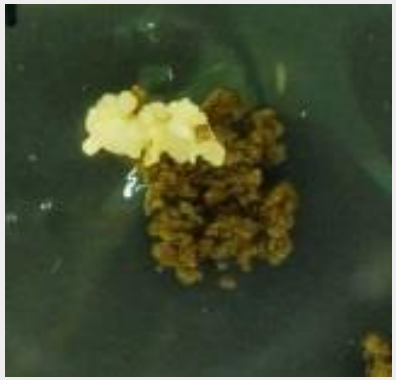
Las técnicas de cultivo in vitro ofrecen otras alternativas a la producción de plantas transgénicas

Variación somaclonal para inducir tolerancia a patógenos fúngicos



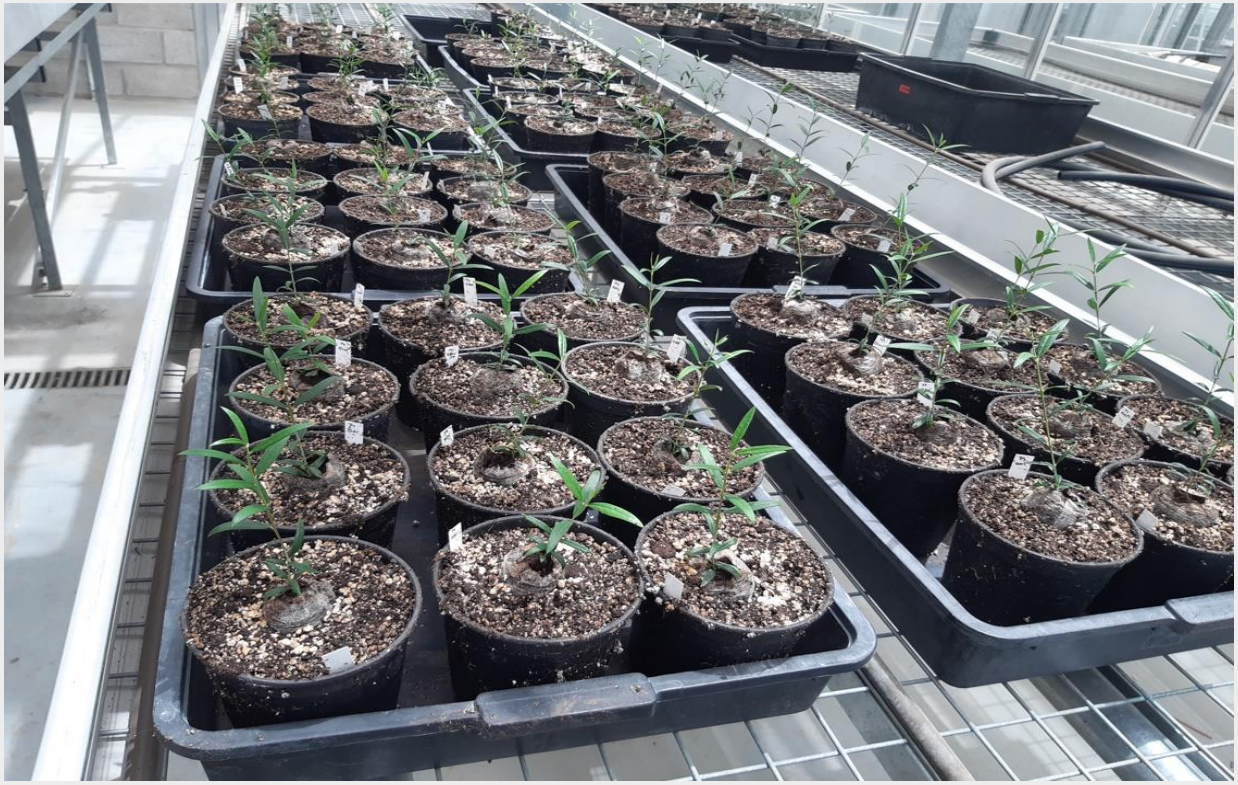


Cultivos embriogénicos de olivo en presencia de filtrado del hongo (*Verticillium dahliae* o *Rosellinia necatrix*)



Las técnicas de cultivo in vitro ofrecen otras alternativas a la producción de plantas transgénicas

Variación somaclonal para inducir tolerancia a patógenos fúngicos

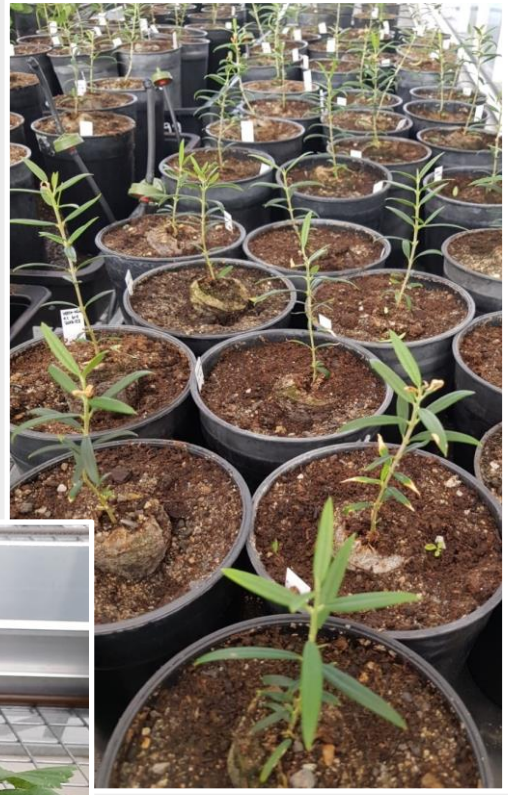


Crecimiento de las plantas en invernadero para testar su tolerancia a patógenos

Las técnicas de cultivo in vitro ofrecen otras alternativas a la producción de plantas transgénicas

Obtención de plantas tetraploides:

Uso de tetraploides de olivo como portainjerto. Las plantas poliploides tienen mayor plasticidad fenotípica y mayor tolerancia a estrés



En fresa, los tetraploides de especies silvestres hibridan más fácilmente con la fresa octoploide (introducción de genes de resistencia a patógenos)

IHSM-Universidad de Málaga:

Fernando Pliego Alfaro
Antonio J. Matas Arroyo
Miguel A. Quesada Felice
Sara Posé Albacete
Elena Palomo Ríos
Candelas Paniagua Correas
Isabel Narváez Jurado
Laia Ribalta Campos

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular-UCO:
Juan Muñoz Blanco

Dpto. de Agronomía-UCO:
Rafael Jiménez Díaz

Instituto de Agricultura Sostenible-Córdoba:
Carlos López Herrera

Instituto de la Grasa-Sevilla:
José M. Martínez Rivas

University of Leeds:
J. Paul Knox

The Hebrew University of Jerusalem:
Alon Samach