



ATN-RF-18757-RG Edición Genética para el Mejoramiento en Especies Vegetales y Animales

Producto 1.2. Protocolos para la regeneración de plantas de papa a partir de protoplastos

Matías Nicolás González, Gabriela Alejandra Massa, Mariette Andersson, Leonardo Storani, Niklas Olsson, Cecilia Andrea Décima Oneto, Per Hofvander, y Sergio Enrique Feingold

2025



Códigos JEL: Q16

ISBN:

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un mecanismo único de cooperación técnica entre países de América Latina, el Caribe y España, que promueve la competitividad y la seguridad alimentaria. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Matías Nicolás González, Gabriela Alejandra Massa, Mariette Andersson, Leonardo Storani, Niklas Olsson, Cecilia Andrea Décima Oneto, Per Hofvander, y Sergio Enrique Feingold

Copyright © 2025 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org



Tabla de Contenidos

Abstract	4
Resumen EJECUTIVO.....	5
Introducción	6
Protocolo de regeneración de plantas de variedades de papa a partir de protoplastos editados genéticamente.....	7
Descripción general	7
Principales etapas del protocolo.....	7
Resultados.....	7
Publicación científica generada de este producto está disponible en:.....	8
Instituciones participantes.....	9



ABSTRACT

The development of efficient protocols for regenerating potato plants from protoplasts represents a key advancement for gene editing and the improvement of elite cultivars. Due to the high heterozygosity and tetraploidy of *Solanum tuberosum*, regeneration from protoplasts enables the introduction of specific variability through targeted edits and the generation of genetically improved plants without the stable integration of foreign DNA into the genome. The published work describes an optimized methodological platform that integrates CRISPR/Cas9 editing using ribonucleoprotein (RNP) complexes, protoplast transfection, and subsequent regeneration into whole plants.

The protocol emphasizes critical steps such as guide design targeting all alleles of the gene of interest, the isolation of viable protoplasts, efficient transfection, and regeneration through cell culture and organogenesis. Culture media, growth regulators, and incubation conditions required for competent callus formation and shoot development are detailed, followed by the identification of edited lines using molecular methods such as CAPS and high-resolution fragment analysis (HRFA). This methodology has proven suitable both for gene-function studies and for breeding programs aimed at generating new traits in potato.

This protocol constitutes a practical and strategic tool to accelerate innovation in potato breeding, enabling precise modifications with reduced regulatory constraints when using RNP-based editing. The research was published in the book *Plant Genome Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Springer Nature, 2023, in the chapter titled “CRISPR/Cas9 Technology for Potato Functional Genomics and Breeding” by González et al. (pp. 333–358), supporting its scientific validity and applicability for the development of new commercial varieties.

Key words: Potato, CRISPR/Cas9, Genome editing, Functional genomics, Crop breeding, *Agrobacterium tumefaciens*, Protoplasts, Ribonucleoprotein complexes



RESUMEN EJECUTIVO

El desarrollo de protocolos eficientes para la regeneración de plantas de papa a partir de protoplastos es un avance clave para la edición génica y el mejoramiento de variedades elite. Debido a la alta heterocigosidad y tetraploidía en *Solanum tuberosum*, la regeneración desde protoplastos permite introducir variaciones específicas a través de ediciones dirigidas y obtener plantas genéticamente mejoradas sin la integración estable de ADN foráneo en el genoma. En el trabajo publicado, se describe una plataforma metodológica optimizada que integra la edición CRISPR/Cas9 mediante complejos ribonucleoproteicos (RNP), la transfección de protoplastos y su subsecuente regeneración en plantas completas.

El protocolo enfatiza pasos críticos como el diseño de guías dirigidas a todos los alelos del gen blanco, la obtención de protoplastos viables, la transfección eficiente y la regeneración mediante cultivos celulares y organogénesis. Se detallan medios de cultivo, reguladores de crecimiento y condiciones de incubación necesarios para la formación de callos competentes y el desarrollo de brotes, seguido por la identificación de líneas editadas mediante métodos moleculares como CAPS y análisis de fragmentos de alta resolución (HRFA). Esta metodología ha demostrado ser adecuada tanto para estudios de funcionalidad génica como para programas de mejoramiento orientados a generar nuevos caracteres en papa.

Este protocolo constituye una herramienta práctica y estratégica para acelerar la innovación en papa, permitiendo modificaciones precisas con menores riesgos regulatorios cuando se emplea la edición con RNP. La investigación fue publicada en el libro *Plant Genome Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Springer Nature, 2023, en el capítulo titulado “*CRISPR/Cas9 Technology for Potato Functional Genomics and Breeding*” por González et al. (pp. 333–358), lo que respalda su validez científica y su aplicabilidad para el desarrollo de nuevas variedades comerciales.

Palabras Clave: Papa, CRISPR/Cas9, Edición Genética, Genómica Funcional, Mejoramiento Genético, *Agrobacterium tumefaciens*, Protoplastos, Ribonucleoproteínas



INTRODUCCIÓN

La regeneración de plantas de papa a partir de protoplastos editados representa un avance estratégico para fortalecer el mejoramiento genético en América Latina y el Caribe. En esta actividad (1.1), se priorizó la validación y adecuación de protocolos que permitan regenerar variedades de alto interés productivo para Argentina, Chile, Brasil y Uruguay, atendiendo a las particularidades genómicas y fisiológicas de cada una. Esta línea de trabajo se orientó a superar las limitaciones asociadas a la heterocigosidad y propagación vegetativa de la papa, habilitando la incorporación de características agronómicas mejoradas mediante edición génica de precisión.

Asimismo, el aislamiento, la transformación y la regeneración a partir de protoplastos son pilares fundamentales en la implementación de CRISPR/Cas9 para papa. Esta metodología facilitó el uso de complejos ribonucleoproteicos sin integración estable de ADN foráneo, una característica esencial para mantener la aceptabilidad regulatoria y acelerar la transferencia tecnológica al sector productivo. El ajuste fino de los protocolos locales, basado en la experiencia de los laboratorios participantes, asegura una correcta adaptación a las variedades comerciales utilizadas en la región.

El presente reporte técnico consolida los procedimientos aplicados y estandarizados para la regeneración de plantas a partir de protoplastos en variedades seleccionadas, describiendo los pasos críticos del proceso, los criterios de evaluación y las recomendaciones para su implementación regional. Este documento constituye un producto clave del proyecto, ya que establece las bases metodológicas para futuras líneas de investigación y para el desarrollo de variedades editadas que respondan a desafíos productivos y sanitarios prioritarios para los países miembros de FONTAGRO. Los resultados de este trabajo se publicaron en: en el libro *Plant Genome Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Springer Nature, 2023, en el capítulo titulado “*CRISPR/Cas9 Technology for Potato Functional Genomics and Breeding*” por González et al. (pp. 333–358).



PROTOCOLO DE REGENERACIÓN DE PLANTAS DE VARIEDADES DE PAPA A PARTIR DE PROTOPLASTOS EDITADOS GENÉTICAMENTE

Descripción general

En el marco del desarrollo de tecnologías de vanguardia para el mejoramiento de papa en América Latina y el Caribe, se implementó un protocolo especializado para la regeneración de plantas desde protoplastos en variedades cultivadas de *Solanum tuberosum* L. Este procedimiento constituye una herramienta altamente eficaz para la aplicación de edición génica, particularmente mediante CRISPR/Cas9, permitiendo la obtención de plantas con modificaciones específicas en genes de interés agronómico sin la incorporación estable de ADN foráneo en el genoma. Esto resulta esencial en cultivos vegetativamente propagados y altamente heterocigóticos como la papa, donde la mejora tradicional presenta limitaciones.

Principales etapas del protocolo

El proceso comprende:

1. **Diseño y selección de guías CRISPR específicas** para la edición de genes blanco en todas las copias alélicas.
2. **Aislamiento y transfección de protoplastos**, mediante complejos ribonucleoproteicos (RNP) que combinan Cas9 con sgRNA para minimizar la inserción de secuencias externas.
3. **Regeneración y formación de callos y brotes** en condiciones controladas de cultivo in vitro, utilizando reguladores de crecimiento y medios específicos para reprogramar las células hacia la organogénesis.
4. **Caracterización molecular de plantas regeneradas**, empleando métodos sensibles como CAPS y análisis de fragmentos de alta resolución (HRFA); este paso permite identificar deleciones/inserciones y confirmar plantas editadas con pérdida funcional del gen objetivo.

Resultados

Gracias a su precisión y reproducibilidad, este protocolo es adecuado para generar líneas de papa editadas destinadas tanto a investigación de función génica como a programas regionales de innovación en mejoramiento genético. Su adopción fortalece las capacidades regionales en tecnologías de frontera, acelera el desarrollo de nuevos rasgos de interés (sanidad, calidad, rendimiento), y ofrece un camino claro para futuras variedades con menor carga regulatoria cuando no se integra ADN foráneo.



Publicación científica generada de este producto está disponible en:

González, M. N., Massa, G. A., Andersson, M., Storani, L., Olsson, N., Décima Oneto, C. A., Hofvander, P., & Feingold, S. E. (2023). **CRISPR/Cas9 Technology for Potato Functional Genomics and Breeding**. In *Plant Genome Engineering: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology, vol. 2653, pp. 333–358). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3131-7_21

INSTITUCIONES PARTICIPANTES



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org