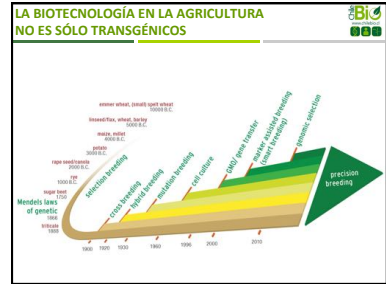
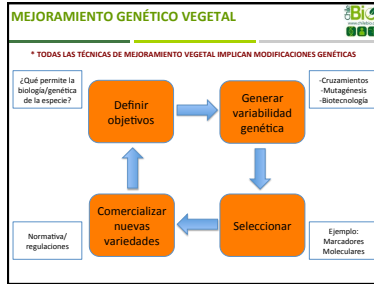


  
**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**  
*...más allá de la transgenia*  
 Miguel Angel Sánchez  
 Biólogo, Doctor en Ciencias Biológicas (PhD)  
 Director Ejecutivo  
[masanchez@chilebio.cl](mailto:masanchez@chilebio.cl)  
 CHILEBIO    @ChileBio\_AG



**EVOLUCIÓN DEL MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL**

1900

Cruzamientos

**MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL**

**CRUCES DIRIGIDOS Y SELECCIÓN ARTIFICIAL**

\* TODAS LAS TÉCNICAS DE MEJORAMIENTO VEGETAL IMPLICAN MODIFICACIONES GENÉTICAS

Solanum pimpinellifolium    Solanum lycopersicum    Solanum lycopersicum

**EVOLUCIÓN DEL MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL**

1900    1990

Cruzamientos    Mutagénesis (mutaciones inducidas)

**MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL**

**MUTAGÉNESIS**

\* 2217 variedades registradas obtenidas por mutagénesis  
 FAO/IAEA (<http://www.sfnccs.iaea.org/NBPV/>)

Campo de irradiación de rayos gamma Cobalto 60  
 Invernadero

Mutaciones inducidas por radiación gamma  
 Mutaciones inducidas por luz UV  
 Mutaciones inducidas por químicos  
 Mutaciones inducidas por temperatura

**EVOLUCIÓN DEL MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL**

1900    1920    1930    1950    1970

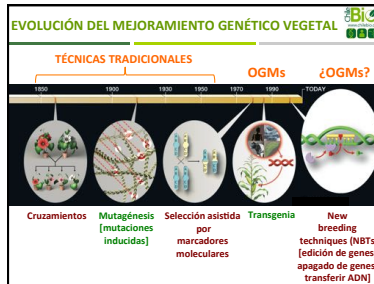
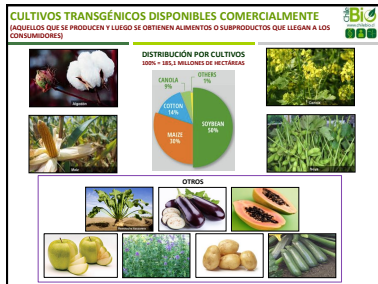
Cruzamientos    Mutagénesis (mutaciones inducidas)    Selección asistida por marcadores moleculares

**EVOLUCIÓN DEL MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL**

**OGMs**

1900    1920    1930    1950    1970    1990

Cruzamientos    Mutagénesis (mutaciones inducidas)    Selección asistida por marcadores moleculares    Transgenia



### NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)

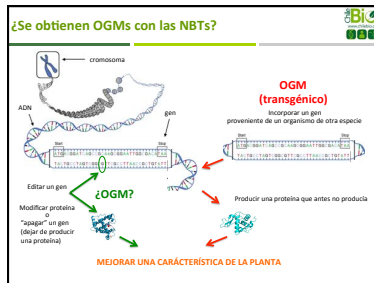
**COSTOS COMPARADOS**

ANÁLISIS REGULATORIOS	OGM	NBT
Caracterización molecular del inserto, vector, construcción	SI	SI
Estabilidad genotípica	SI	NO
Productos expresados y su mecanismo de acción	SI	NO
Caracterización fenotípica	SI	SI
Estudios bioinformáticos	SI	NO
Caracterización del sitio de inserción	SI	NO
Niveles de expresión	SI	NO
Ensayos regulados a campo	SI	NO
Análisis composicional	SI	NO
Caracterización agronómica	SI	NO
Estrés biótico y abiótico	SI	NO

### DEFINICIONES CLAVES

**ORGANISMO GENÉTICAMENTE MODIFICADO**  
 Organismo en el que el material genético ha sido modificado de una manera que no se produce naturalmente por cruzamiento y/o recombinación natural.

**ORGANISMO VIVO MODIFICADO**  
 Organismo vivo que tiene una nueva combinación de material genético que ha sido obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna.



### NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)

Grupo de técnicas que permiten:

- ✓ Generar cambios en sitios específicos del genoma (edición del genoma);
- ✓ Silenciar la expresión de genes (apagado de genes);
- ✓ Transferir ADN entre individuos sexualmente compatibles o no.

**"NBTs"**

1. OGM
2. SDN (1, 2, 3)
3. Cigenia
4. Portainjertos GM
5. Agro-infiltración
6. RDOM
7. Breeding Reverse

Costo: Disminución (Downward arrow)  
 Conocimiento: Especificidad, Eficiencia (Upward arrow)

*"En la mayoría de los casos, con el uso de NBTs, los productos resultantes son indistinguibles de aquellos obtenidos por técnicas "tradicionales" de mejoramiento genético."*

### NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)

**Mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (ODM)**

**RTDS**  
 Rapid Trait Development System

**GROV**  
 Gene Repair Oligonucleotide

**CATEGORÍA 1:**  
 Introducción transiente del ADN durante un paso intermedio del desarrollo del producto final. El producto final no se distingue de los productos del mejoramiento convencional.

### SU CANOLA™: DESARROLLADA POR ODM

*"SU Canola (Sulfonylurea Tolerant) has received Plant Novel Trait (PNT) approval by the Canadian Food Inspection Agency (CFIA) and Health Canada (HC)."*

*"RTDS has been recognized by the USDA as a mutagenesis technique, and is therefore not subject to the regulations applied to transgenic (or GM) crops."*

### SU CANOLA™: DESARROLLADA POR ODM

**\*Partners - BASF, Rotam**

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**  
**"SDN: Site-Directed Nuclease"**

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**  
**"SDN: Site-Directed Nuclease"**

**CATEGORÍA 1: (SDN-1 y SDN-2)**  
 Introducción transiente del ADN durante un paso intermedio del desarrollo del producto final. El producto final no se distingue de los productos del mejoramiento convencional.

**CATEGORÍA 3: (SDN-3)**  
 Introducción estable del ADN en el producto final

**RETROCUCES PARA ELIMINAR TRANSGENES**

Generación	P1	P1x1	P2x2	P3x3	P4x4
Recurrent Parent	50%	75%	87.5%	93.8%	96.9%

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**  
**"SDN: Site-Directed Nuclease"**

	ZFN	TALEN	CRISPR
Binding	Protein-DNA	Protein-DNA	RNA-DNA
Cleavage	ZFN-FIK1 fusion protein	TALEN-FIK1 fusion protein	Cas9
Target	Pair	Pair	No
Work mode	Pair	Pair	No
Design	Moderate	Easy	Very easy
Construction	Difficult	Easy	Very easy
Time to implementation	3-7	3-7	1-3
Cost	High	Moderate	Low
Multiplexing	Variable	High	High
Off-target rate	High but variable	Low	High
Length of target	~18 to 24 bp (single)	~50-60 bp (double)	~20 bp (single)
Sequence	5'-7 bp spacer	18-19 bp spacer	-

Chen & Gao 2014, Plant Cell Rep. 33(4):575-83

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**

**Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout**

Almacén en frío  
 ✓ evitar brotes  
 ✓ aumentar vida pos cosecha

Sacarosa  
 Fructosa + glucosa  
 Favorece  
 x Rendimiento  
 x Acramida (al calentar o freír)  
 x azúcares + ciertos azúcares

TALEN

Chen & Gao 2014, Plant Cell Rep. 33(4):575-83

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**

Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family

Celectis

\*Se ha comprobado que los ácidos grasos omega-9 pueden contribuir a disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y accidentes cerebrovasculares.

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**

TALEN-Based Mutagenesis of Lipoxigenase LOX3 Enhances the Storage Tolerance of Rice (*Oryza sativa*) Seeds

Chen & Gao 2014, Plant Cell Rep. 33(4):575-83

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**

Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation

**POLIPLENOCAS (PPO)**  
 CRISPR

\*\*Apagando 1 de 6 genes PPO se logró reducir en un 30% la actividad enzimática que provoca el pardeamiento.

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**

Digoxin-Like Mediated Genome Editing Provides Precision and Function to Engineered Nucleases and Antibiotics in Plants

WT, A23, Surfactant only

Glyphosate (10.0 mM), Glyphosate (21.0 mM)

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**

**Genetics**

Variation in the flowering gene *SELF PRUNING 5G* promotes day-neutrality and early yield in tomato

Genes repressores de la floración (provocan floración tardía):  
-*sp5g*  
-*sp*

\*Las plantas con el gen *sp5g* "apagado" florecen antes y sus frutos maduran antes (2 semanas)

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**

**Plant Biotechnology**

\*La pérdida de la función de genes *mlo* en cebada, *Arabidopsis* y tomate provoca resistencia a hongos que producen oídio.

Oídio del trigo causado por *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*

Simultaneous editing of three homeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew

Yueping Wang<sup>1,2</sup>, Xi Cheng<sup>1,2</sup>, Qihou Shao<sup>1,2</sup>, Yi Zhang<sup>1,2</sup>, Binling Liu<sup>1</sup>, Cailin Guo<sup>1</sup> & Ru-Lang Qiu<sup>1,2</sup>

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**

**Biotechnology Journal**

Low-gluten, non-transgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9

Abstract

CRISPR/Cas9-mediated genome editing is generally performed randomly by the region of guide sequences from wheat, barley, and rice. The guide gene family of wheat contains 1000 highly polymorphic copies of CRISPRs. We first identified 1000 polymorphic copies in wheat, the designed two guides to target a conserved region adjacent to two coding sequences for the 5' end of the guide genes. Targeted mutation was generated at a strong drive reduction in gluten. 50 to 70 different genes were included in one of the 1000 CRISPR/Cas9 guide families for targeting, with approximately 1000 genes edited. In this study, we generated 1000 different CRISPR/Cas9-mediated wheat mutants. The low-gluten, non-transgenic wheat lines have been used to study the genetic diversity of wheat and to improve the wheat yield and wheat quality.

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**

**SCIENTIFIC REPORTS**

CRISPR/Cas9-induced Targeted Mitogenesis and Gene Replacement to Generate Long-shelf Life Tomato Lines

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**

**CISGENIA**

INGENIERIA GÉNÉTICA

**CATEGORÍA 3:** Introducción estable del ADN en el producto final. \*\*\*El producto final no se distingue de los productos del mejoramiento convencional.

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**

**PLOS ONE**

**CISGENIA**

Development of the First Cisgenic Apple with Increased Resistance to Fire Blight

Fire blight = "quemadura" producida por la bacteria *Erwinia amylovora*

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**

**CISGENIA**

Cisgenic apple trees: development, characterization, and performance

A Phenotypic, Molecular and Biochemical Characterization of the First Cisgenic Non-Resistant Apple Variety 'Gala'

Cisgenic *Red* non-resistant apple lines show no difference in fruit transpiration when compared with nontransgenic best cultivars

\*La sarna del manzano es causada por el hongo *Venturia inaequalis*

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**

**"SEGREGANTES NEGATIVOS"**

METILACIÓN DEL ADN MEDIADA POR ARN

✓ La metilación del DNA permite el silenciamiento de genes bloqueando la transcripción

✓ Es heredable (epigenética)

**CATEGORÍA 2:** Introducción estable del ADN durante un paso intermedio del desarrollo del producto final. El producto final no se distingue de los productos del mejoramiento convencional.

**NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)**

**PORTAINJERTOS GM**

GM rootstock grafting

Non-GM scion

GM rootstock

**CATEGORÍA 3:** Introducción estable del ADN en el producto final. \*\*\*Las características modificadas no son heredables ya que están sólo en el portainjertos.

### NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)

**DETECCIÓN** de una modificación genética significa que es posible determinar la existencia de un cambio en el material genético de un organismo (por ejemplo al nivel de ADN a través de la presencia de una nueva secuencia de ADN) por referencia a un comparador apropiado.

**IDENTIFICACIÓN** de una modificación genética significa que es posible no sólo detectar la existencia de un cambio en el material genético de un organismo, sino también que es posible identificar la modificación genética intencionalmente introducida por una nueva técnica.

DETECCIÓN	IDENTIFICACIÓN
SON-3	SON-3
INTRAGENIA	INTRAGENIA
PORTANUEVOS GM	PORTANUEVOS GM
DETECCIÓN	IDENTIFICACIÓN
SON-1, 2	SON-1, 2
CRISPR	CRISPR
ODM	ODM
DETECCIÓN	IDENTIFICACIÓN
SON-3	SON-3
BREEDING REVERSO	BREEDING REVERSO
VÁSTAGOS NO GM	VÁSTAGOS NO GM

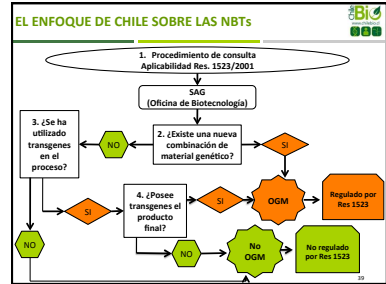
### PARA CONSIDERAR SOBRE LAS NBTs

**¿Se debe regular el desarrollo y uso de variedades vegetales en las cuales**

a) no hay ninguna nueva combinación de material genético?  
no hay genes o ADN foráneo en el producto final.  
ODM, SON-1 y 2 (CRISPR, TALEN, ZINC FINGER), R2DM, BR, etc.

b) hay una inserción estable de genes provenientes de una especie sexualmente compatible?  
cigénica

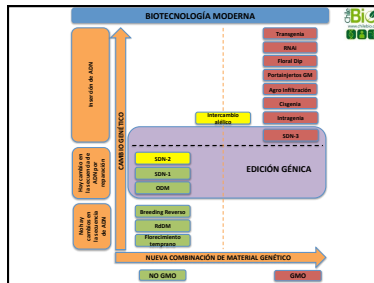
c) la variación genética es el resultado de mutagénesis (espontánea, inducida o dirigida)?  
ODM, SON-1 y 2 (CRISPR, TALEN, ZINC FINGER)



### DEFINICIONES CLAVES EN CHILE

**ORGANISMO VIVO MODIFICADO**  
*Organismo vivo que tiene una nueva combinación de material genético que ha sido obtenida mediante la aplicación de la biotecnología moderna.*

**NUEVA COMBINACIÓN DE MATERIAL GENÉTICO**  
*Inserción estable de uno o más genes o secuencias de ADN que codifiquen proteínas, ARN de interferencia, ARN de doble hebra, péptidos de señalización o secuencias regulatorias.*



### NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)

**CONCLUSIONES**

Las NBTs permiten:

1. Fomentar la innovación en mejoramiento vegetal;
2. Acelerar la velocidad en la obtención de nuevas variedades vegetales;
3. Desarrollar variedades con características que serían muy costosas o no podían ser logradas mediante mejoramiento convencional;
4. Desarrollar variedades que únicamente podían ser logradas mediante transgenia;
5. Incrementar la precisión del mejoramiento vegetal;
6. Incrementar la variabilidad genética

Además:

7. Están en rápida y permanente evolución.
8. (Algunas) dan como resultado plantas que no contienen material transgénico y no es posible diferenciarlas de las obtenidas por técnicas de mejoramiento tradicional.
9. Están siendo utilizadas por diversas compañías e instituciones públicas y los productos derivados de las mismas ya están en condiciones de entrar al mercado.

### NEW BREEDING TECHNIQUES (NBTs)

*...más allá de la transgenia*

Miguel Angel Sánchez  
Biólogo, Doctor en Ciencias Biológicas (PhD)  
Director Ejecutivo  
masanchez@chilebio.cl

CHILEBIO @ChileBio\_AG