

“Ciencia para las nuevas biotecnologías; las exigencias de conocimiento científico para su desarrollo”

Patricio Arce

Me referiré a cómo las ciencias son un apoyo a las biotecnologías para el desarrollo. Lo fundamental primero que debo resaltar es lo que tiene que ver con biotecnología y es que ésta no tendría sentido si es que no está inserta dentro de un programa de mejoramiento genético. En general, prácticamente casi todas las aplicaciones biotecnológicas tendrían una lógica si se insertaran dentro de un programa. Yo les voy a comentar algunos ejemplos, especialmente asociados al programa de mejoramiento genético de vides en que nosotros participamos. Una característica importante que a la gente de la industria chilena asociado al consorcio de la industria de la fruta le interesa, es desarrollar nuevas variedades de uvas chilenas, la mayoría, prácticamente todas las variedades que hoy día utilizamos en Chile son variedades desarrolladas afuera que los royalty pronto van a operar y podrían tener problemas, entonces la industria decidió en conjunto con algunas instituciones científicas, el desarrollar las propias variedades y para ello lo que se hace, las flores que son hermafroditas en el caso de la vid, se emasculan, es decir, se les remueven las estructuras masculinas, se deja la flor femenina y con el polen de otra variedad se poliniza para que el óvulo o el embrión que queda ahí más tarde se va a desarrollar, se pueda rescatar y por cruce de una buena madre y un buen padre se genere una nueva variedad. Eso se hace por miles, las plantas se pasan a invernadero, posteriormente a sembraderos, se llevan al campo y después de 4 a 5 años uno puede visualizar los frutos si tienen las características deseadas y si año a año se va haciendo esto, nosotros suponemos que en unos 8 a 9 años más podríamos comenzar a tener las primeras selecciones y en 10 años las primeras variedades.

El sueño de la gente de la industria es ojala tener alguna variedad con un gran tamaño y prácticamente con unos vestigios de semillas, puesto que hoy día la tendencia es a generar variedades sin semillas y esto como les digo puede demorar unos 10 a 11 años. Como las herramientas básicamente, a propósito de las ciencias, pueden ayudar a que alguno de estos procesos puedan ser más rápidos y ser herramientas biotecnológicas al servicio del mejoramiento genético, una de estas herramientas importantes es lo que hoy día se conoce como la genómica funcional. La genómica funcional es una técnica que tienen como finalidad describir la función biológica de los genes, hoy día ustedes deben saber que se han secuenciado los genomas de diversos organismos de seres humanos, de animales y también de plantas, entonces estas aproximaciones de genómica son a gran escala, y por tanto, permiten evaluar la expresión de cientos o miles de genes. En el caso de la uva que yo les estaba mencionando recién, el genoma completo de la uva que ya se secuenció tiene del orden de treinta mil genes y si esos genes o secuencias de ellos son espoteadas en vidrios pueden ser leídas y eventualmente todo el genoma de esos organismos podría ser evaluado en un solo elemento experimental. Entonces, las herramientas tienen una alta potencialidad para este estudio de diferentes procesos, por ejemplo en relación al riego, un tipo de riego respecto a otro, distintas temperaturas, distinta radiación, distinta respuesta a patógenos, una planta control respecto de una planta tratada, uno puede saber de todo el genoma cuáles de ellas son afectadas por condiciones tanto abióticas como condiciones bióticas.

Aquí les voy a mostrar un ejemplo, acá tenemos la misma variedad infectada por virus que impide que se puedan acumular los antocianos y, por tanto, que pueda ser adportada y, además, son frutos bastante más ácidos respecto de la fruta sana, se extraen RNA de las sanas, de las infectadas se marcan y en este cuadradito que está acá abajo, que no es más de un centímetro cuadrado, están impresos quince mil genes o secuencias génicas de la uva, entonces estos RNA que reflejan la condición de enfermedad respecto de la condición sana se hibrida uno con el otro, se analizan mediante pruebas de informática y

finalmente entregan cuales son aquellos genes que se están afectando producto del virus. Lo que aquí les estoy mostrando, esta raya larga que ustedes ven, cada uno de estos son miles de genes, desde la punta hasta el final están los quince mil genes que yo les acabo de mostrar y los distintos colores muestran si un gen se ha expresado o se ha inducido y obviamente después de analizar frutos sanos e infectados durante la pinta o durante la maduración los distintos colores nos van a indicar cuales de todos estos genes funcionan en forma coordinada o cuales de ellos en proceso específico se pueden distinguir y después que uno los agrupa puede llegar a conocer los 10 genes de un proceso o alguno en particular que es clave para el desarrollo del fruto, para el color, para la resistencia a patógenos, lo que fuera. Bajo esa aproximación uno puede llegar a conocer, por ejemplo, los genes que controlan el desarrollo del fruto y aquí les muestro un ejemplo en que se ha utilizado uno de estos genes que tiene que ver con la biosíntesis de gibelina. La gibelina es una importante fitohormona de planta que se expresa en numerosas partes de la planta y un desarrollo importante, está asociado al desarrollo del fruto, para que el fruto se desarrolle requiere la producción de gibelina y este es un gen clave para que ello ocurra.

Aquí yo les estoy mostrando un ejemplo, estos son tomates modificados genéticamente, el que estoy apuntando respecto del tomate control. El tomate control tiene sus semillas, en cambio el tomate modificado con este gen que tiene que ver con la biosíntesis gibelina bajo el control de un promotor de expresión exclusiva en el ovario, puede permitir la remoción de las semillas y sí el desarrollo del fruto, lo que yo les mostré recién, que se podían desarrollar frutos sin semillas es la uva, por ejemplo, que se podía demorar entre 10 o 12 años, si uno tienen suerte esto se puede hacer un poco más corto. Esto que lo hemos hecho en tomate, obviamente puede ser muy importante de hacerlo en uva, se podría hacer en palto, también en chirimoya y eventualmente uno podría tener el mismo fenotipo. Para mostrarle como estas aproximaciones permiten identificar quien es clave por ejemplo para la formación de semillas.

Un segundo ejemplo que en la mañana ya me di cuenta la importancia que tiene, tiene que ver con el agua, para decirlo en palabras sencillas, o el estrés hídrico, todos sabemos que va a haber un problema de suministros de agua importante en los próximos años y las aproximaciones biotecnológicas también pueden ayudarnos en este sentido. Yo les voy a contar algunos ejemplos de lo que estamos haciendo en tomates y en cítrico para desarrollar plantas tolerantes al déficit hídrico y a la salinidad y aquí están las damas responsables de ese trabajo. Ya se ha hecho en algunos otros laboratorios, se han utilizado algunos genes con este propósito, aquí yo les muestro canola que está sobre expresando un gen de un transportador, éste es un transportador de sodio, una proteína de membrana que básicamente lo que hace, saca de la célula del sodio y lo deja en la vacuola o en el extracelular y lo intercambia por protón. Acá tenemos dos canolas silvestres no transformadas y ustedes ven cuando son regadas con 200 milimoles de cloruro de sodio, estas canolas son incapaces de crecer, lo que tenemos a la izquierda, aquí tenemos dos, cuatro y seis líneas transgénicas de canola que expresan poco, más o mucho de este transportador, y aquellas líneas que tienen una alta expresión y son las que están a la izquierda como ustedes ven pueden crecer y producir semillas similares a las plantas waltai siendo regadas con 200 milimoles de cloruro de sodio que aproximadamente es la mitad del agua de mar. Esto, sin lugar a dudas, es un avance importante, como un gen puede permitir que sean regadas las plantas con la mitad de la concentración de la salinidad del mar y que puedan seguir creciendo y produciendo semillas. Lo mismo está acá a la derecha en tomates, estos son tomates que han sido modificados con este mismo gen, también han sido regados con la misma cantidad salina, estos son los tomates controles y como ustedes ven pueden crecer y pueden inclusive desarrollar frutos y lo más importante es que esta salinidad se acumula en las hojas y no en los frutos, habría sido ideal tener a lo mejor los tomates salados de una, pero por suerte para otros frutales esta estrategia permite que las sales se acumulen en las hojas y los frutos están carentes de él y pueden crecer sin problemas.

Hay otros genes que también se han utilizado para propósitos similares, por ejemplo, para salinidad y sequía, uno de esto es el ADT1 que está asociado con el metabolismo del fósforo, acá tenemos plantas waltai o plantas modificadas genéticamente, que han sido regadas también con soluciones salinas y como ustedes ven estas plantas modificadas genéticamente toleran la sal, en cambio las plantas waltai, no lo hacen. Un experimento muy importante es el que aparece aquí a la derecha, estas son plantas de tomate, las que están a la derecha son plantas transformadas, las que están a la izquierda son plantas controles, plantas controles y plantas transformadas fueron dejadas de regar por 13 días, prácticamente 2 semanas, después de que estas plantas se dejaron de regar se volvieron a regar y obviamente las plantas waltai no fueron capaces de crecer, se marchitaron, se murieron. En cambio a pesar de que las plantas transgénicas se dejaron de regar 2 semanas sin agua fueron capaces de recuperarse y volver a crecer, esto muestra la gran importancia como un puro gen puede dar características de tolerancia a la salinidad y tolerancia al déficit hídrico de forma simultánea.

Otro ejemplo importante tiene que ver con genes que tienen que ver con la desoxidación en general prácticamente todos los estrés, estrés salino, estrés por frío, por altas temperaturas, por patógeno en última instancia en la planta producen un estrés oxidativo, eso es desajuste de electrones para decirlo en palabras sencillas, la planta codifica estos genes para las enzimas gloxilaza 1 y gloxilaza 2 que básicamente arregla los desequilibrios electrónicos producto de la condición de estrés, lo que aquí yo les muestro son semillas de tabaco en el cuadrante izquierdo son plantitas waltai gloxilaza 1, gloxilaza 2 y gloxilaza 1 y 2 es decir estas tres son plantas transgénicas que se ha transformado con un gen, con un segundo gen o con los dos en forma simultánea respecto al waltai crecidas en 100 milimoles de cloruro de sodio 200 o 400 y como ustedes ven inclusive en 200 milimoles de sodio estas semillas transgénicas plantitas en este caso pueden crecer sobre todo aquellas que tienen estos dos genes en forma simultánea y cuando son regadas en forma continua por tres meses la planta waltai es incapaz de crecer en cambio las gloxilaza 1 o 2 o ambas pueden crecer y producir flores demostrando como este sistema antioxidante es otra estrategia para poder tolerar altas concentraciones salinas y la falta de agua.

Un tercer o cuarto gen relevante, son genes que se conocen como factores de transcripción, este es un ejemplo de ello, los factores de transcripción son pequeñas proteínas que se unen a la secuencia promotora de un gen, la región que permite que este gen se exprese o no se pueden unir a miles de ellos porque estas proteínas reconocen pequeñas secuencias, aquí a la izquierda tenemos arroz transformado respecto del control y una cosa similar a la que les he mostrado con este gen, cuando son regadas con sal las líneas transgénicas como ven pueden ir creciendo bastante bien, en cambio no lo pueden hacer las no transformadas, y acá en la parte superior respecto a la inferior waltai son crisantemos que se han expuesto a un shock térmico de 45 grados por 36 horas y como ustedes ven los crisantemos waltai se mueren, en cambio aquellas plantas transformadas son capaces de tolerar un shock térmico tan alto que podría ser homólogo a altas condiciones de temperatura en algún periodo de sequía importante, por ejemplo este es un trabajo que acaba de salir publicado este año.

Nosotros hemos utilizado este tipo de tecnología y estos genes para tratar de evaluar en algunos modelos como el tabaco y también como cítrico, lo que hemos hecho en cítrico, hemos seleccionado junto con la industria aquellos portainjertos que son más relevantes y que particularmente podrían crecer en el norte de nuestro país, se sometieron a concentraciones de salinidad los distintos portainjertos en repeticiones, y se seleccionaron aquellos portainjertos naturalmente más resistente, aquellos más resistentes se desarrollaron sistemas de regeneración y de transformación con genes que les acabo de mostrar para poder incrementar la resistencia natural, estos se seleccionan se evalúan a nivel molecular que tengan los transgenes, se hacen las pruebas en condiciones de laboratorio y posteriormente de invernadero para finalmente salir a campo, toda esta parte ya nosotros en el laboratorio ya lo hemos hecho y hoy día tenemos plantas en invernadero que presentan incrementada tolerancia a la salinidad y les voy a mostrar

algún ejemplo de ello. Para hacer eso tomamos hipocotilos de semillas de varias variedades por ejemplo rubidu por eso se van a ver estos hipocotilos medios etiolados por que han estado dos semanas bajo la oscuridad, si esto después lo dejamos 4 semanas en oscuridad y 2 en luz expuesto en presencia de la agrobacterium como ustedes ven comienzan a dar brotes y por haber estado con agrobacterium uno de estos brotes podrían tener o portar los genes de interés que a nosotros nos interesan, es así que hemos generado muchas líneas aquí les muestro genes controles y genes que expresan por ejemplo este factor de transición que les mostré el CDF3 que podría conferir tolerancia, este gen tiene la gracia que permite conferir tolerancia tanto al frío, como al calor, como a la salinidad, es un gen muy interesante que puede generar resistencia a múltiples condiciones de estrés y portainjertos de cítricos que portan ese gen en el laboratorio hoy día existen y ellas son las plantas transgénicas tenemos autorización del Servicio Agrícola Ganadero porque estos tienen que manejarse en condiciones muy restrictivas como ustedes ven son plantas que están muy controladas, este es un invernadero que tiene doble puerta, pediluvio, tienes que estar con llave y por cierto con acceso restringido para poder hacer estas pruebas de evaluación del material que tenemos en condiciones controladas. Aquí les muestro de manera sencilla la diferencia que se pueden diferenciar de pruebas muy preliminares de pruebas que se están haciendo de plantas que presentan más tolerancia respecto de las plantas controles mostrado que ya tenemos algunos portainjertos con una incrementada tolerancia respecto de los controles, no sabemos si esta incrementada tolerancia va a ser suficiente, por ejemplo para tolerar los suelos del norte del país, pero con seguridad como la foto lo evidencia mayor tolerancia que las plantas no transformadas con toda seguridad.

Otro ejemplo que puede servir de estas nuevas tecnologías tiene que ver con resistencia a patógenos, todos sabemos que los hongos son un problema muy importante en la agricultura y aquí les voy a mostrar un ejemplo con este hongo *botrytis cinérea*. *Botrytis cinerea* es un hongo o patógeno que afecta diversos cultivos la vid, prácticamente casi todos los frutales especialmente en condiciones de post cosechas, a diferencia de lo que han hecho otros, lo que hemos hecho, hemos estudiado el ciclo infectivo del hongo en lo que tiene que ver cuando sus esporas se adhieren o germinan o se produce el crecimiento de la IFA sobre el tejido o la penetración de la IFA sobre el tejido o la invasión, la colonización y la formación de conidia. En cada uno de estos estadios se ha aislado el RNA para poder evaluar cuales son los genes que se están expresando en cada uno de estos estadios por tanto saber cómo hace el hongo para poder desarrollar su ciclo infectivo, junto con eso se han hecho mutantes con alguno de estos genes claves y aquí les muestro por ejemplo un mutante en el crecimiento, este es el crecimiento del hongo en la placa control y este el crecimiento que tiene el mutante prácticamente muy poco crecimiento porque se ha hecho un knock-out a un gen fundamental para el crecimiento, aquí abajo lo que les muestro es un pequeño mutante que tienen que ver con un gen que afecta a la germinación de las esporas, esta es la germinación de las esporas del waltai, esta es la no germinación de las esporas del modificado mutante, entonces si uno pudiera expresar en una planta aquellos genes que les impidan germinar y que simultáneamente o posteriormente le impidan crecer podríamos quizá conseguir incrementar la tolerancia a este hongo problemático con estos genes que hemos descubierto del propio hongo.

Y el ultimo ejemplo que les voy a mostrar es lo que tiene que ver con tolerancia a virus, los virus son un problema muy importante en la agricultura y en las vid de nosotros hemos desarrollado un sistema de regeneración de transformación genética, y hoy día se puede si uno expresa una secuencia en sentido y en antisentido contra la secuencia de un virus un duplex, se podría eventualmente conseguir resistencia, si esa secuencia corresponde al virus, nosotros estamos transformando portainjertos de vides puesto que esta señal es móvil del portainjertos hacia la parte aérea, la variedad perfectamente podría ser una variedad waltai, es decir la fruta que se produciría sería la misma fruta que hoy día producimos sobre un portainjertos modificado genéticamente, nosotros hemos hecho eso, hemos transformado portainjertos 110 Richter resistente contra el GFLB y sobre ellos hemos injertado plantas que tienen este virus de esta manera, y aquí lo que ustedes tienen es una prueba muy sencilla, aquí estamos detectando la presencia

del virus en vides utilizados para este porta injerto, como ustedes ven todas las pruebas que se utilizaron antes como porta injertos presentadas en el virus y aquí abajo están los injertos esa línea, esa línea y esa otra línea no presentan el virus que antes si estaba puesto que estos RNA degradaron el virus y hemos generado plantas sanas a partir de las plantas enfermas, ó sea lo que nos enseñaron alguna vez de que una planta que tuviera un virus era imposible de que se curara, yo le estoy demostrando que eso no es efectivo, como tuvimos éxito para poder conseguir resistencia a un virus hemos sido ambiciosos y estamos haciendo construcción ahora que aportan secuencias para uno, dos, tres, cuatro y cinco virus en forma simultanea si esto llegara a resultar podríamos conseguir futuras plantas que sean resistentes a múltiples virus utilizando estas aproximaciones biotecnológicas que hoy día tenemos disponibles.