

Mejoramiento Genético del Manzano: incorporación de resistencia a *Venturia inaequalis* mediante Cisgenia

Javier Chilian P.,
Licenciado en Genética,
Dr (c) en Ingeniería Genética Vegetal.
jchilian@inia.cl

Mario Paredes C.,
Ingeniero Agrónomo,
Ph.D. en Genética Vegetal.

Viviana Becerra V.,
Ingeniera Agrónoma,
M. Sc. Genética vegetal.

Uberlinda Luengo,
Laboratorio de Biotecnología
INIA - Quilamapu



Figura 1. Fruto de manzano con un fuerte ataque de *Venturia inaequalis*

La sarna del manzano, causada por el hongo *Venturia inaequalis*, es uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta al manzano en el país. La presencia de este hongo genera severos daños en la planta y calidad de la fruta (Fig. 1) y por lo tanto, importantes pérdidas económicas al afectar la comercialización de la misma en los mercados nacionales e internacionales.

Actualmente, el control de esta enfermedad se realiza en base a fungicidas, necesiéndose en promedio entre 10 y 15 aplicaciones para prevenir la infección, lo que se traduce en un incremento significativo en el costo de producción, en problemas ambientales y de salud, como también en acumulación de residuos en la fruta, y en la posible aparición de nuevas razas resistentes a los fungicidas utilizados. Por lo tanto, una disminución en el número de aplicaciones de fungicidas beneficiaría directamente a los agricultores, al medioambiente, a los consumidores y al comercio internacional, debido a las altas exigencias de calidad e inocuidad en frutas de exportación.

Para reducir la cantidad de aplicaciones de fungicidas, se han utilizado diferentes métodos de control de venturia, tales como la sanitización y el control biológico, pero ninguno de ellos ha sido completamente exitoso.

Una alternativa complementaria, y que se ha estado desarrollando en el INIA Quilamapu desde 1995 dentro del Programa de Mejoramiento Genético de Manzanos (PMGM), ha sido el desarrollo de cultivares genéticamente resistentes.

Para ello el PMGM ha introducido material resistente, el cual se ha cruzado con variedades de interés, para realizar una selección fenotípica de líneas experimentales resistentes a esta enfermedad.

Si bien en los primeros cruces de las plantas heredaron el gen de resistencia, el fruto de las primeras progenies carecía de la calidad requerida por los estándares comerciales debido a que estas plantas heredaron también genes que afectaron la calidad del fruto. Para eliminar estos genes no deseados y lograr huertos con el carácter de "resistencia" incorporado y con frutos de buena calidad se requirieron retro-

cruzas sucesivas (al menos por 5 generaciones) entre la progenie resistente obtenida y las variedades susceptibles a venturia, con alta calidad de fruto. Producto de lo cual y considerando el ciclo vegetativo largo del manzano, el desarrollo de nuevas variedades a través del mejoramiento convencional resulta ser un proceso lento, laborioso y de alto costo.

Bajo este escenario, una tecnología como la cisgenia permite la introducción de un gen específico para mejorar una característica agronómica importante como es la resistencia a venturia, en una variedad de manzano altamente aceptada por los consumidores, fruticultores y para la industria.

Transformación Genética

La ingeniería genética, a través de la transgenia, nos proporciona una nueva oportunidad para transferir genes entre diferentes

especies, que estaba limitada por el mejoramiento convencional por la compatibilidad del cruzamiento y la obtención de una progenie fértil.

Es así que la transgenia ofrece básicamente tres ventajas respecto de las técnicas convencionales de mejoramiento vegetal: 1) los genes que se van a incorporar pueden provenir de cualquier especie, emparentada o no (por ejemplo, un gen de una bacteria puede incorporarse a una planta), 2) se puede introducir uno o un par de genes en un solo proceso, preservando en su descendencia el resto de los genes de la planta original, y 3) el proceso de modificación genética toma un menor tiempo comparado al cruzamiento convencional para lograr un objetivo similar.

A pesar de las ventajas señaladas, el avance de los cultivos transgénicos trajo aparejado un profundo debate sobre las implicancias ambientales, económicas y sanitarias de su uso.

En relación a este último punto, existen dos aspectos principales que preocupan a los consumidores con respecto a la transgenia, el primero está relacionado con el origen (procedencia) de los genes de interés que se transfieren, ya que muchas veces ellos son de diferentes especies, géneros e incluso reinos, y en segundo lugar, la presencia de genes marcadores de selección que podrían transmitir resistencia a antibióticos. Para desarrollar una agricultura más limpia, sustentable y que elimine las preocupaciones de los consumidores, se desarrolló un nuevo concepto de transformación genética denominada "Cisgenia".

Innovación tecnológica: Cisgenesis

La cisgenia está definida como una modificación genética, donde los genes transferidos provienen de una especie sexualmente compatible (emparentado genéticamente). El gen en cuestión debe contener sus intrones y exones nativos y sus propias regiones reguladoras (promotor y terminador), por lo cual la planta cisgénica podría ser considerada equivalente a una planta mejorada mediante el método convencional. El concepto fundamental, es que los genes que se intercambian pertenecen al mismo acervo genético de la especie. Esta característica, es una de las que nos permite distinguir entre una planta cisgénica y una transgénica, ya que esta última posee genes de organismos que normalmente no intercambiarían material genético o incluso combinaciones artificiales de regiones codificantes con secuencias regulatorias de otro gen.

Una segunda característica de gran importancia es la referida a los genes marcadores de selección. La cisgenia combina el conocimiento de la secuencia de los genes y sus funciones con tecnologías "limpias" que permiten eliminar los marcadores de selección (por ejemplo, resistentes a antibióticos). De esta forma, las dos principales preocupaciones asociadas a las plantas transgénicas no existirían en las plantas cisgénicas.

Tecnología de vector limpio.

La cisgenia, como herramienta de transformación genética, en sus pasos iniciales usa genes marcadores para poder seleccionar los explantes transformados con el gen de

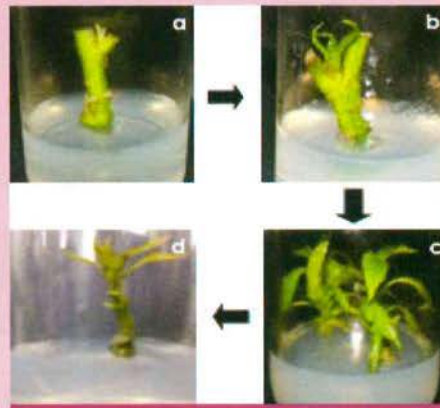


Figura 2. Regeneración de manzano in vitro a partir de yemas axilares. (a y b) nudos con yemas axilares en medio de inducción, (c) en medio de multiplicación y (d) en medio de enraizamiento.

interés. Como innovación biotecnológica, la cisgenia tiene la ventaja de poder eliminar dichos genes marcadores una vez que cumplieron su objetivo.

Hasta ahora, existen dos formas de eliminar los genes marcadores desde las plantas transgénicas. En la primera de ellas los genes marcadores de selección y el gen de interés son introducidos en diferentes loci del genoma de la planta por co-transformación, después de lo cual el marcador de selección segrega y es eliminado mediante cruce sexual. La segunda, incluye la eliminación del gen de selección mediante un proceso de transposición o por recombinación específica. El segundo método se presenta más favorable para especies de vida reproductiva larga, que se pueden propagar vegetativamente, como la mayoría de los frutales.

Basados en ello, el Plant Research International (PRI) de la Universidad de Wageningen (Holanda), generó un vector de transformación que combina, un gen de resistencia a antibiótico (gen marcador) para realizar la selección inicial (selección positiva) con un sitio específico de recombinación inducible que es capaz de remover el gen marcador.

Paralelamente, dentro del sitio de recombinación existe un marcador para realizar una selección negativa, para prevenir el desarrollo de plantas que aún conserven ambos marcadores. Ejemplo de la producción de plantas cisgénicas es el desarrollo

de frutillas modificadas genéticamente con una mayor tolerancia a *Botrytis cinerea* y papas cisgénicas con resistencia durable a tizón tardío. También con esta metodología el Plant Research International desarrolló líneas cisgénicas de manzana con resistencia a venturia. Estos árboles genéticamente modificados cuando fueron puestos en contacto con el hongo sufrieron un menor daño (60%) que los árboles no modificados, lo que significó una disminución importante en la aplicación de fungicida, hecho que se enmarca dentro del concepto de desarrollar una agricultura más limpia.

La cisgenia está definida como una modificación genética, donde los genes transferidos provienen de una especie sexualmente compatible (emparentado genéticamente).

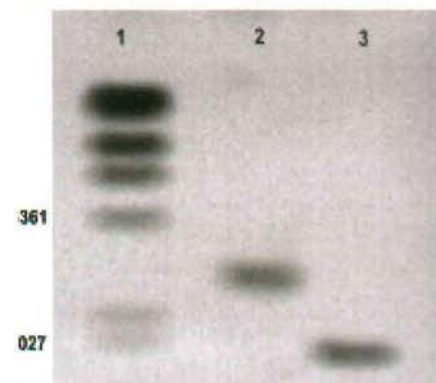


Figura 3. Producto de PCR sobre ADN genómico de la variedad portadora del gen de resistencia.

Cisgenia en el INIA

Basados en estos hechos, en INIA Quilmapu se está desarrollando una plataforma para producir manzanas cisgénicas mejoradas en cuanto al carácter resistencia al hongo *Venturia inaequalis* en colaboración con la Universidad de Wageningen.

Para implementar la transformación genética como herramienta de laboratorio, uno de los requisitos fundamentales fue contar con métodos de regeneración *in vitro*, para ello en el laboratorio de biotecnología se establecieron protocolos que permitieron la

regeneración de plantas desde yemas axilares y la organogénesis somática a partir de segmentos foliares de manzano Var. Royal Gala (Fig 2). También se estandarizaron los protocolos para la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, se aislaron los genes y éstos, en la actualidad, se encuentran en su etapa de clonación para su posterior secuenciación e inserción en los vectores binarios adecuados (Fig. 3), donde se aprecia que el Carril 1 representa marcador de peso molecular λ HindIII, carril 2 representa la región codificante y terminador del gen Vf2 y carril 3 representa el fragmento que contiene la región promo-

tora del gen Vf2.

Un paso importante para la implementación de la referida tecnología, lo constituyó la adquisición del vector de transformación desde el PRI.

Es importante destacar que el establecimiento de una plataforma de cisgenia en manzano optimizaría los tiempos de obtención de variedades con características específicas, reduciéndose significativamente el tiempo en un 30-40%.

