

CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACION CARILLANCA  
TEMUCO - IX REGION DE LA ARAUCANIA

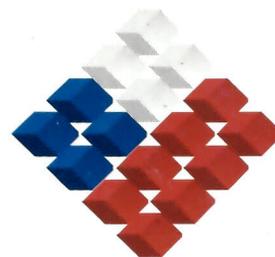
**PROYECTOS DE DESARROLLO E  
INNOVACION EN BIOTECNOLOGIA 2001**

**Integración de genes de  
lupino en el genoma del trigo,  
con potencial para movilizar  
el fósforo inorgánico retenido  
en los suelos del centro-sur y  
sur de Chile**

Agente Postulante: INIA-CRI Carillanca

DICIEMBRE DE 2001

TEMUCO-CHILE



GOBIERNO DE CHILE  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
AGROPECUARIAS

FUNDACION PARA LA INNOVACION  
AGRARIA-FIA



FOLIO DE BASES

CÓDIGO  
(uso interno)

**1. ANTECEDENTES GENERALES DEL PROYECTO**

**NOMBRE DEL PROYECTO:**

Línea Temática:  Rubro:

Región(es) de Ejecución:

Fecha de Inicio:

DURACIÓN:

Fecha de Término:

**AGENTE POSTULANTE:**

Nombre : INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIA)  
Dirección : Fidel Oteiza 1956, Providencia. Ciudad y Región: Santiago, RM  
RUT :  
Teléfono : 225 2118 Fax: 225 8773  
Cuenta Bancaria (tipo, N°, banco):

**AGENTES ASOCIADOS:** UNIVERSIDAD DE CHILE  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

**REPRESENTANTE LEGAL DEL AGENTE POSTULANTE:**

Nombre: Francisco Javier González del Río  
Cargo en el agente postulante: Director Nacional  
RUT:  
Dirección: Fidel Oteiza 1956, Providencia Firma: Ciudad y Región: Santiago, RM  
Fono: 225 2118 Fax: 225 8773 e-mail fgonzale@presidencia.inia.cl

**COSTO TOTAL DEL PROYECTO** : \$   
(Valores Reajustados)

**FINANCIAMIENTO SOLICITADO** : \$   %  
(Valores Reajustados)

**APORTE DE CONTRAPARTE** : \$   %  
(Valores Reajustados)



## 2. EQUIPO DE COORDINACIÓN Y EQUIPO TÉCNICO DEL PROYECTO

### 2.1. Equipo de coordinación del proyecto

(presentar en Anexo A información solicitada sobre los Coordinadores)

#### COORDINADOR DEL PROYECTO

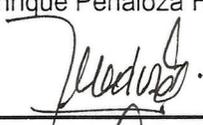
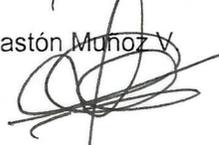
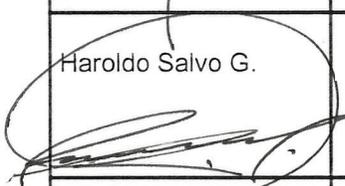
NOMBRE ENRIQUE PEÑALOZA HERNANDEZ	RUT	FIRMA 
AGENTE INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS, CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACION CARILLANCA	DEDICACIÓN PROYECTO (%/año)  50%	
CARGO ACTUAL INVESTIGADOR	CASILLA 58-D	
DIRECCIÓN  CAMINO CAJON-VILCUN, KM 10	CIUDAD  TEMUCO	
FONO 45-215706 FAX 45-216112	E-MAIL epenaloza@carillanca.inia.cl	

#### COORDINADOR ALTERNO DEL PROYECTO

NOMBRE GASTON MUÑOZ VERA	RUT	FIRMA 
AGENTE INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS, CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACION CARILLANCA	DEDICACIÓN PROYECTO %año  30%	
CARGO ACTUAL INVESTIGADOR	CASILLA 58-D	
DIRECCIÓN  CAMINO CAJON-VILCUN, KM 10	CIUDAD  TEMUCO	
FONO 45-215706 FAX 45-216112	EMAIL gmunoz@carillanca.inia.cl	



**2.2 . Equipo Técnico del Proyecto**  
**(presentar en Anexo A información solicitada sobre los miembros del equipo técnico)**

Nombre Completo y Firma	RUT	Profesión	Especialidad	Función y Actividad en el Proyecto	Dedicación al Proyecto (%/año)
Enrique Peñaloza H. 		Ing. Agrónomo	Fisiología Molecular	Coordinador proyec. Aislamiento y caracterizac.genes; caracteriz, fisiológ. plantas transgénicas	50%
Gastón Muñoz V. 		Bioquímico	Biología Molecular	Coordinador alterno. Construcción de vectores y genoteca, análisis PCR y secuenciación	30%
Haroldo Salvo G. 		Ing Agrónomo	Genética Molecular y Transgenia	Transformación de trigo y caracterizac. genético-molecular	25%
Herman Silva A.		Bioquímico	Biología Molecular Vegetal y Transgenia	Aislamiento y caracterización de promotores	10%
Luis J. Corcuera P.		Profesor	Fisiología Vegetal	Caract. fisiológica (fotosíntesis) de plantas transgénicas	5%
Ricardo Campillo R.		Ing.Agrónomo	Fertilidad de Suelos	Caracterización nutricional de plantas transgénicas	5%
Paola Rathgeb F.		Ing.Ejec.Agríc.	Biología Molecular	Apoyo en técnicas de biología molecular	30%
Lorena Díaz A.		Téc. Univ. en. Prod. Agrícola.	Cultivo de Tejidos	Apoyo en transgénesis y regeneración de plantas	50%
NN		Técnico Agrícola		Apoyo técnico en trabajos de invernadero laboratorio, y otros	100%



### 3. BREVE RESUMEN DEL PROYECTO

El trigo (*Triticum aestivum*) es el principal cultivo de la agricultura chilena representando el 50% de las 828.000 ha dedicadas a siembras anuales. El 90% de su superficie se ubica en suelos volcánicos de la VII a X regiones los que, por su naturaleza química, poseen una alta capacidad de retención de fósforo (P). Estudios realizados en el sur del país indican que el 86% del P agregado como fertilizante queda adsorbido en los coloides de estos suelos, inaccesible para cultivos como el trigo. De acuerdo a esta tasa promedio de retención, y al consumo de fertilizantes fosfatados en trigo, aproximadamente 44.000 Ton quedan anualmente retenidos en el suelo. En términos económicos y utilizando cifras conservadoras, esta situación está provocando una pérdida de disponibilidad y almacenamiento de P de aproximadamente US\$ 20 millones anuales, lo que pudiera traducirse en un problema ecológico de magnitud, al ritmo actual de uso de este insumo agrícola. Una de las opciones para acceder a esta "reserva" de P consiste en su movilización mediante ácidos orgánicos. La exudación de ácidos orgánicos es una de las estrategias adaptativas más sobresalientes utilizadas por algunas plantas superiores para acceder al P retenido en el suelo y, paralelamente, tolerar concentraciones de aluminio fitotóxico. Esta estrategia está restringida a un grupo selecto de plantas, entre las que se incluye el lupino blanco (*Lupinus albus*) entre las especies cultivadas.

Considerando las significativas reservas de P en estos suelos, la necesidad de aumentar la competitividad de agriculturas tecnificadas del centro-sur y sur del país, de reducir el efecto de la baja disponibilidad de P sobre el rendimiento del trigo en la pequeña agricultura, y de atenuar el impacto ambiental del uso excesivo de fertilizantes fosfatados, este proyecto se ha planteado como objetivo, desarrollar cultivares de trigo con habilidad para movilizar el P retenido en el suelo. Debido a que esta característica no está presente en trigo, la propuesta considera la transgénesis con genes aislados desde lupino blanco. Para cumplir este objetivo, se realizará un estudio integrado en tres etapas: a) producción de plantas transgénicas mediante biobalística, con el gen que codifica para la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) de lupino blanco, enzima que participa en la fijación autotrófica de carbono y acumulación de ácidos orgánicos en plantas; b), identificación, caracterización y evaluación mediante transgenia en trigo, de genes de lupino blanco asociados con la exudación de ácidos orgánicos y c), identificación de promotores raíz-específicos, modulados por la disponibilidad de P, y su utilización con el gen de la PEPC, u otros genes potenciales en trigo.

Esta propuesta involucra estudios fisiológicos, metabólicos, moleculares y citogenéticos, y representa una estrategia integrada para enfrentar uno de los principales problemas de la agricultura del sur de Chile. Su desarrollo, con un costo total de \$ 225,8 millones, permitirá disponer de la tecnología para transformar trigo en el país, de plantas transgénicas con el gen de la PEPC, experimentales, con habilidad para movilizar P inorgánico, y de una reserva de genes modulados por la deficiencia de P, eventualmente utilizables y potencialmente patentables. Se espera que tanto la tecnología como el enfoque propuesto, puedan ser transferibles a otros cultivos de importancia económica.

El impacto de esta nueva tecnología permitirá: a), reducir el nivel de uso de fertilizantes fosfatados; b), reducir los costos de producción de trigo en agriculturas tecnificadas; c), aumentar el rendimiento promedio en la pequeña agricultura y d), disminuir el impacto ambiental negativo de la aplicación de altas dosis de fertilizantes fosfatados en los suelos derivados de cenizas volcánicas del centro-sur y sur del país.





#### 4. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA A RESOLVER

El impacto de la tecnología sobre la productividad de los cultivos en la agricultura moderna se ha basado esencialmente en la aplicación masiva de fertilizantes, siendo el fósforo y el nitrógeno los de mayor consumo e importancia. El fósforo (P) constituye uno de los factores más limitantes de la producción agrícola, principalmente en los suelos derivados de cenizas volcánicas, superando incluso a las deficiencias de otros nutrientes como el nitrógeno, el calcio, el magnesio o el potasio. En Iberoamérica en general, y en Chile en particular, esta situación ha creado una fuerte subordinación del desarrollo agropecuario al suministro de P ya que, exceptuando Brasil, todos los demás países dependen casi exclusivamente de las importaciones de este elemento (Besoain, 1999).

De las 5,5 millones de ha de suelos arables en el país, el 41% está representado por suelos de origen volcánico. Estos se concentran principalmente entre la VII y X regiones, donde se desarrolla la mayor proporción de los cultivos anuales. Por su naturaleza química, estos suelos poseen una alta capacidad para inmovilizar el P, con tasas de retención fluctuantes entre el 57 y 99% del P aplicado como fertilizante, con un promedio de 86% (Pino *et al.*, 1998). Este promedio es consistente con lo informado en diversos países, cuya agricultura se desarrolla en suelos con alta capacidad de fijación de P (Stevens, 1997).

El trigo corresponde al cultivo de mayor importancia económica en el país, con una superficie de siembra que en la última temporada representó 414.000 ha, o el 50% de la superficie total dedicada a cultivos anuales. Más del 90% de esta superficie se localiza en suelos derivados de cenizas volcánicas, de manera que la aplicación de fertilizantes fosfatados en dosis significativamente superiores a los requerimientos de la planta, es una práctica de manejo habitual de cultivo del trigo en estos suelos. Para dosis de P entre 50 y 100 kg/ha aplicados en forma localizada, ensayos de campo han determinado una eficiencia de uso de fertilizantes fosfatados entre 8 y 19% (Montenegro *et al.*, 1999). Estos bajos valores de eficiencia de uso se justifican por los elevados niveles de retención de P en estos suelos, y explican la necesidad de utilizar dosis de P 80 a 90% superiores a las requeridas por el cultivo

La baja eficiencia de uso de los fertilizantes fosfatados pudiera también estar asociada a mecanismos de absorción de P ineficientes. Sin embargo, se ha demostrado que las plantas sometidas a la deficiencia de P activan transportadores de P de alta afinidad, que les permiten absorber más eficientemente este nutriente desde el suelo. Esta estrategia adaptativa se ha observado en todas las plantas evaluadas, de manera que representaría una respuesta al estrés, generalizada entre las especies (Raghothama, 1999). Independiente de la afinidad para absorber P, la función de estos transportadores está obviamente condicionada a la presencia de este nutriente en la solución del suelo. Consecuentemente, la principal limitación de las plantas en suelos volcánicos no estaría determinada por su habilidad para absorber P, sino por su capacidad para acceder al P retenido en estos suelos.

El consumo de fertilizantes fosfatados se ha incrementado sostenidamente en Chile durante las dos últimas décadas, representando en la actualidad alrededor de 155.000 Ton.



Estimaciones muy conservadoras sobre el uso de fertilizantes fosfatados en trigo indican que, en la actualidad, entre la VII y X regiones se consumen alrededor de 51.000 Ton anuales, con un costo aproximado de US\$ 12 millones (Cuadro 1, pág. 22). La continua aplicación de fertilizantes fosfatados en estos suelos volcánicos se ha traducido en la retención de cantidades significativas de P en su perfil. Considerando una tasa promedio de retención de P de 86%, en estos suelos se estarían depositando anualmente 43.700 Ton de  $P_2O_5$ , equivalente a US\$ 20 millones, no disponible para los cultivos. De acuerdo a estas estimaciones conservadoras, la aplicación de fertilizantes fosfatados en suelos ubicados entre la VII y X regiones, ha provocado una acumulación de P equivalente a US\$ 200 millones, sólo durante los últimos 10 años. A modo de referencia, se estima que alrededor de US\$ 10 billones están retenidos en los suelos australianos, sólo como consecuencia de la aplicación de fertilizantes fosfatados en la agricultura. De acuerdo a cifras recientes, Australia anualmente consume US\$ 600 millones en fertilizantes fosfatados, 80% de los cuales quedan inmovilizados ([http:// www.sciro.au](http://www.sciro.au)).

La retención de fosfatos en suelos de origen volcánico reviste importancia económica, técnica y científica para el país, por las particulares relaciones químicas que ocurren entre los fosfatos y los suelos volcánicos. Influir sobre estas reacciones tratando de atenuar la retención de P es una línea de investigación prioritaria para el país (Besoain, 1999). Cómo mejorar la movilización de P retenido en los suelos es una pregunta que se han planteado no sólo investigadores en Chile, sino también representa en la actualidad uno de los mayores desafíos que enfrenta la investigación sobre este aspecto en el mundo (Stevens, 1997; Raghothama, 1999, 2000; López-Bucio, 2000; Delhaize *et al.*, 2001). La respuesta parece estar en un grupo selecto de especies que utilizan la exudación de ácidos orgánicos para acceder al P retenido en el suelo, permitiéndoles reproducirse en ambientes limitados en la disponibilidad de P en solución. Recientemente, la ingeniería genética ha comenzado a explotar esta estrategia, demostrándose que la capacidad para movilizar el P desde fuentes insolubles puede mejorar significativamente en plantas que sobreproducen ácido orgánicos, y los exudan en la rizósfera. Esta estrategia representan una de las alternativas más racionales para reducir el uso de fertilizantes fosfatados, y lograr una agricultura más sustentable (Stevens, 1997; Raghotama, 2000; López-Bucio *et al.*, 2000).

En línea con los numerosos estudios realizados en Chile respecto a la problemática de la retención de P en suelos volcánicos, y con recientes avances de la investigación mundial en el tema, en este proyecto se plantea una estrategia biotecnológica para movilizar y utilizar el P retenido en el suelo. Esta estrategia se aplicará al cultivo anual de mayor importancia económica y social del centro-sur y sur del país, utilizando un enfoque de investigación integrada. La propuesta lleva implícita el desarrollo de una herramienta biotecnológica nueva, dirigida a favorecer la competitividad del sector agropecuario, y con una orientación esencialmente productiva en el mediano plazo. Se espera que esta iniciativa pueda eventualmente extenderse a otros cultivos de importancia económica, cumpliendo el perfil requerido por la Fundación para la Innovación Agraria en la presente convocatoria.



## 5. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

### 1. Situación actual y potencial de los fertilizantes fosfatados en el país

De acuerdo a estadísticas de la FAO, la producción de alimentos en el mundo prácticamente se duplicó entre los años 1961 y 1996. Esta situación se acompañó por un incremento de 3,48 veces la utilización de fertilizantes fosfatados asumiéndose que, en un escenario simple y optimista, la relación permanecerá linear durante las próximas 4 décadas (Tilmann, 1999). Basado en esta predicción, se estima que la utilización de fertilizantes fosfatados debería incrementarse desde  $37 \times 10^6$  Ton métricas a  $94 \times 10^6$  Ton métricas por año, para duplicar la producción de alimentos en los próximos 40 años.

La alternativa para incrementar la producción de alimentos a través de la expansión de la agricultura hacia suelos marginales, está usualmente restringida por factores edáficos que limitan drásticamente la productividad de los cultivos. Esto es particularmente evidente en los suelos del sur del país los que, por su carácter ácido y alta capacidad de retener P bajo formas insolubles, restringen sus posibilidades de uso agrícola. Debido a problemas asociados con la química del suelo, la recuperación de suelos marginales haría necesario aplicar altas cantidades de fertilizantes para mantener una producción sostenible. En este eventual escenario de mediano a largo plazo, la mantención de los niveles actuales de uso de fertilizantes fosfatados en la agricultura del centro sur y sur de Chile, o su incremento, contribuirá sólo a aumentar el "pool" de fósforo retenido en los suelos.

En la mayoría de los países del mundo, los fertilizantes que se usan para corregir las deficiencias de P contienen fosfato soluble en agua y, como productos, tienen un costo industrial adicional. Una alternativa a estos fertilizantes lo constituyen las rocas fosfóricas solubles en suelos ácidos y potencialmente susceptibles de uso agrícola. La aplicación directa de las rocas fosfóricas a los suelos, como una alternativa de uso de fertilizante más económico en los cultivos, ha sido intensamente estudiada en el mundo durante la última década. Los primeros experimentos de campo destinados a evaluar el valor fertilizante práctico de rocas fosfóricas en Chile se iniciaron en la década del 50, y se sistematizaron a partir de 1983. El libro "Las Rocas Fosfóricas y sus Posibilidades de Uso Agrícola en Chile" resume los resultados de estas experiencias. De acuerdo a las conclusiones de estos estudios, la principal limitación para el uso de esta alternativa de fuentes fosfatadas es su lenta solubilidad y, consecuentemente, recomendada sólo en cultivos de extenso período vegetativo y con alta actividad biológica (i.e. praderas), o en especies como el lupino blanco. Adicionalmente, las reducidas reservas de minerales fosfóricos que posee el país, unido a la baja concentración de P que los caracterizan, condicionarían su eventual utilización como fuente de P. En este escenario, nuestra agricultura continuará dependiendo de las importaciones de fertilizantes fosfatados, la que en la actualidad representan más de US\$ 35 millones anuales. De esta cifra, se estima que alrededor de US\$ 20 millones anuales se fijará en los suelos del centro sur y sur del país. Acceder a este "pool" de fosfatos representa un desafío que debe enfrentar el país, cuyos resultados se traducirán en reducción del costos de producción de los cultivos y, consecuentemente, en una agricultura más competitiva.



## 2. Estrategias para movilizar el fósforo retenido en los suelos

En el suelo, el P es absorbido preferentemente como ion ortofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). En su forma aniónica, el P es altamente reactivo, formando compuestos de baja solubilidad con aluminio (Al) y hierro (Fe) en suelos ácidos, y con calcio (Ca) y magnesio (Mg) en suelos neutros y alcalinos (Tisdale *et al.*, 1975). Estas reacciones químicas, conocidas como adsorción o fijación de P, son de particular magnitud en suelos volcánicos, y se acentúan significativamente por efecto de la fertilización fosfatada. Las investigaciones realizadas durante los últimos 20 años han demostrado que un mecanismo esencial por el cual las plantas toleran estreses nutricionales ocurre en la interfase suelo-raíz, e involucra la exudación de ácidos orgánicos por las raíces. Como consecuencia de sus altas constantes de afinidad por metales trivalentes como  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , los ácidos orgánicos de cadena corta, como el citrato, malato y oxalato pueden desplazar el P ligado a estos compuestos, dejándolo disponible para su utilización por las plantas (Marschner, 1995).

### 2.1. Plantas transgénicas sobreproductoras de citrato

Existe un grupo selecto de especies vegetales que exudan ácidos orgánicos en respuesta a deficiencias de P en sus ambientes de crecimiento. Basado en esta adaptación metabólica, mediante ingeniería genética se ha comenzado a diseñar plantas sobreproductoras de citrato, dirigidas a explotar la afinidad de este ácido orgánico por  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , elementos químicos a los que frecuentemente está adsorbido el P inorgánico en los suelos. Esta manipulación genética se ha fundamentado en la introducción del gen que codifica para la enzima citrato sintasa, que participa en la conversión de oxaloacetato a citrato en la mitocondria, en presencia de acetil-coA. Plantas de tabaco y papaya transformadas con la citrato sintasa de *Pseudomonas aeruginosa*, acumularon y exudaron 10 veces más citrato que las plantas no transformadas. Estas plantas mostraron superioridad para crecer en sustratos conteniendo Ca-P como única fuente de P, atribuido a las significativas cantidades de citrato exudadas (López-Bucio *et al.*, 2000). Esta evidencia fue precedida por el desarrollo de plantas transgénicas sobreproductoras de citrato, con habilidad para crecer en presencia de concentraciones fitotóxicas de aluminio (de la Fuente *et al.*, 1997). Ambos trabajos, realizados por investigadores mexicanos, han merecido el reconocimiento de la comunidad científica, puesto que representan la primera evidencia que demuestra la factibilidad de inducir tolerancia a aluminio, o a la deficiencia de P, mediante la manipulación de enzimas que participan en el ciclo del carbono en las plantas.

Recientemente, investigadores australianos cuestionaron los resultados de sus pares mexicanos, puesto que la metodología para sobreproducir citrato mediante plantas transgénicas que expresan la citrato sintasa de *Pseudomonas aeruginosa*, no pudo ser replicada (Delhaize *et al.*, 2001). Más que a la estrategia misma, el cuestionamiento se dirigió a metodologías irreproducibles, indicándose que la actividad citrato sintasa cuantificada, no correspondería al gen bacteriano expresado en las plantas transformadas. No obstante lo anterior, la estrategia de plantas sobreproductoras de citrato mediante la introducción del gen de la citrato sintasa recientemente se ha extendido a otras especies, informándose de plantas transgénicas con habilidad para movilizar P desde Al-P en *Arabidopsis* (Koyama *et al.*, 2000) y en trebol blanco (Lyon *et al.*, 2000).





## 2.2. Utilización de especies que exudan citrato en respuesta a la deficiencia de P

Durante su evolución, las plantas han desarrollado adaptaciones morfológicas, fisiológicas y metabólicas que les permiten crecer y establecerse en suelos bajos en P disponible. Estas adaptaciones se han dirigido a explorar más eficientemente el ambiente e incluyen alteraciones en la arquitectura de raíces, asociaciones con hongos micorrízicos, actividad de enzimas glicolíticas alternativas, activación de ribonucleasas y fosfatasas, inducción de transportadores de P de alta afinidad, y liberación de ácidos orgánicos en la rizósfera (Raghothama *et al.*, 1999). Muchas de estas adaptaciones funcionan concertadamente en la planta para mantener la homeostasis del P celular, y representan una estrategia universal en respuesta a la deficiencia de P.

Aun cuando se ha mencionado que las fosfatasas ácidas pudieran participar en la movilización de P desde fuentes orgánicas, la contribución de estas enzimas a la economía del P es aun materia de debate (Yan *et al.*, 2001). De acuerdo a numerosas evidencias, la posibilidad de movilizar el P retenido en el suelo en cantidades significativas, está restringida sólo a la exudación de ácidos orgánicos (Dinkelaker *et al.*, 1995; Jones, 1998; Neumann y Romheld, 2001). La exudación de ácidos orgánicos con tasas suficientes para movilizar el P se ha informado sólo en un limitado número de especies, entre las cuales se incluyen los miembros de la familia Proteaceae, y el lupino blanco (*Lupinus albus*) dentro de las especies cultivadas (Dinkelaker *et al.*, 1995).

El lupino blanco es una leguminosa anual adaptada a suelos ácidos a neutros de escasa fertilidad. Entre las especies cultivadas, es la única que posee la habilidad para establecerse y crecer en suelos bajos en P disponible, atribuido a la capacidad de exudar citrato en la rizósfera (Gardner *et al.*, 1982). Precisamente por esta razón, el lupino blanco es la única especie que ha logrado mantenerse como cultivo comercial en un amplio estrato de la agricultura mapuche de la IX Región, prácticamente desde su introducción al país en la década del 60. En esta especie, la exudación de citrato ocurre a través de estructuras radicales conocidas como raicillas proteoideas, inducidas en la planta sólo en condiciones de deficiencia de P. Esta particularidad única entre las especies cultivadas, ha convertido al lupino blanco en una planta modelo para entender no sólo la fisiología del mecanismo de exudación de citrato, sino también para identificar genes asociados con esta estrategia adaptativa.

## 3. El lupino blanco como fuente de genes asociados con la exudación de citrato

No obstante la reconocida habilidad del lupino blanco para establecerse y crecer en suelos bajos en P disponible, la posibilidad de utilizar esta especie como modelo para identificar genes asociados con esta estrategia adaptativa es una alternativa que solo recientemente se ha comenzado a explorar (Stevens, 1997; Neumann *et al.*, 1999, 2000; Massonneau *et al.*, 2001). Durante los dos últimos años, se han realizado estudios en INIA Carillanca dirigidos a identificar genes de lupino blanco, específicamente asociados con la exudación de citrato. Como consecuencia de este trabajo (Tesis de Doctorado del investigador principal de este proyecto), se identificó un modelo experimental que permitió, analizando solo aproximadamente 20% del total de potenciales ARN mensajeros que se expresan en una célula en un tiempo determinado, aislar 52 productos diferenciales inducidos en tejidos radicales que exudan citrato en respuesta a la deficiencia de P. El análisis de una subpoblación de estos 52 productos permitió identificar genes asociados con esta estrategia.



En la actualidad, INIA Carillanca dispone de fragmentos de cDNA con homología a regiones codificantes para la proteína fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), que participa como ruta adenilato independiente alternativa a la piruvato kinasa en condiciones de deficiencia de P (Plaxton, 1998), para la proteína SQDX, que funciona en el reciclaje de P desde fosfolípidos de membrana en plantas deficientes en P (Benning, 1998), para una proteína inducida por auxinas, además de dos fragmentos cDNAs sin homología a genes conocidos.

Se ha estimado que alrededor de 100 genes se inducirían en condiciones de deficiencia de P en plantas (Raghothama, 1999). Puesto que la exudación de citrato ocurre en respuesta a este estrés, este antecedente sugiere que el eflujo de ácidos orgánicos por las raíces pudiera no ser un evento fisiológico aislado del mecanismo de rescate que opera en plantas deficientes en P (Plaxton 1998). De este modo, la expresión de la citrato sintasa en plantas transgénicas sobreproductoras de citrato (de la Fuente *et al.*, 1997; López-Bucio *et al.*, 2000; Koyama *et al.*, 2000; Lyon *et al.*, 2000), no sería suficiente para soportar las significativas cantidades de carbono utilizadas por la planta durante la exudación. De acuerdo a las evidencias disponibles, existe consenso en el sentido que la exudación de citrato en un tejido en particular, necesariamente debe estar precedida de la acumulación de este ácido orgánico (Hoffland *et al.*, 1992; Neumann *et al.*, 1999; Peñaloza *et al.*, 2001). En consecuencia, una opción alternativa, o complementaria a la citrato sintasa, está representada por enzimas con función carboxilasa que, como consecuencia de su actividad catalítica, contribuyan con carbono para la síntesis de ácidos orgánicos.

#### 4. PEPC como enzima alternativa

Una vía metabólicamente más racional para la sobreproducción de citrato pudiera lograrse mediante la introducción de sólo un gen, cuyo producto desempeñe un papel clave en el funcionamiento de esta estrategia adaptativa. De acuerdo a la función de las enzimas que participan en el ciclo del carbono en raíces, el candidato más probable corresponde a la PEPC. PEPC es una enzima de plantas que cataliza la carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato, generando oxaloacetato y Pi (Melzer y O'Leary, 1987; Chollet, 1996). Esta enzima es particularmente abundante en células del mesófilo de plantas C4 y CAM, participando en la fijación inicial del CO<sub>2</sub> atmosférico durante la fotosíntesis. En plantas C4, esta función permite concentrar el CO<sub>2</sub> alrededor de la enzima Rubisco, preferenciando significativamente su actividad carboxilasa.

Numerosos estudios han demostrado que la enzima PEPC desempeña un papel esencial en la acumulación y exudación de citrato en lupino blanco y otras especies (Hoffland *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1994,1996; Neumann *et al.*, 1999, 2000; Peñaloza *et al.*, 2000, 2001). Esta esencialidad se entiende si se considera que PEPC es la única enzima con función de carboxilación en el metabolismo de los ácidos orgánicos en raíces de plantas deficientes en P. Mediante esta función, la enzima provee de carbono fijado autotróficamente en raíces, suficiente para soportar las significativas cantidades de carbono exudados como citrato en lupino blanco (Johnson *et al.*, 1994,1996). De acuerdo a estos autores, el 25% del carbono exudado como citrato y el 34% del aquel exudado como malato, proviene del carbono fijado autotróficamente por la actividad de carboxilación de la enzima. En consecuencia, PEPC sería el gen de elección para introducir mediante transgénesis, dirigida a acumular y exudar fuentes carbonadas en plantas.



## 5. Propuesta de desarrollo de plantas transgénicas que exuden ácidos orgánicos

### 5.1. El trigo como especie objetivo para transformación con el gen de la PEPC

El trigo (*Triticum aestivum*) es el principal producto de la agricultura chilena representando el 50% de las 828.000 ha dedicadas a cultivos anuales. El 90% de su superficie se ubica en suelos volcánicos de la VII a X regiones los que, por su naturaleza química, poseen una alta capacidad de fijación de fósforo. Los cereales en general, y en particular el trigo, no son especies hábiles para acceder al P retenido en fuentes insolubles (Sepúlveda *et al.*, 1999; Montenegro *et al.*, 1999; Peñaloza *et al.*, 2000). Esta escasa habilidad es una característica genética que no se puede modificar a través del mejoramiento convencional, ya que no se dispone de genotipos potenciales de ser utilizados como progenitores en programas de mejoramiento. Sin embargo, la capacidad de la especie de exudar malato en respuesta a concentraciones fitotóxicas de aluminio (Ryan *et al.*, 1995 ab), sugiere la posibilidad de manipular la exudación de ácidos orgánicos de manera que también responda a la deficiencia de P. Por lo tanto, el mejoramiento genético asistido por transgenia aparece, para esta situación particular, como la única alternativa factible.

Estudios preliminares realizados en INIA Carillanca indican que la actividad específica de la PEPC en raíces de lupino blanco es 3 veces superior a aquella que caracteriza a trigo. De acuerdo a estos resultados, se espera que la expresión de la PEPC de lupino blanco, aumente la fijación de carbono atmosférico en raíces de trigo y, consecuentemente, la producción y acumulación de ácidos orgánicos. Una vez acumulado, el(los) ácido(s) orgánico(s) sería(n) exudado(s) en la rizósfera a través de canales aniónicos, como mecanismo de detoxificación para prevenir acidosis, cuando la sobreproducción excede la capacidad de almacenamiento en la vacuola (Neumann *et al.*, 2000).

Las posibilidades de transgénesis con la PEPC se han explorado en estudios dirigidos a mejorar la eficiencia de la fotosíntesis en plantas C3 (Matsuoka *et al.*, 1994; Gehlen *et al.*, 1996; Beaujean *et al.*, 2001). La introducción de la PEPC de maíz en arroz demostró la factibilidad de instalar un componente de la fotosíntesis de plantas C4 en plantas C3, obteniéndose plantas de arroz con reducida inhibición de la fotosíntesis por fotorespiración (Ku *et al.*, 1999). Aun cuando el beneficio neto de esta modificación no está aun confirmado, esta evidencia demuestra la factibilidad de transgénesis con la PEPC, y la potencialidad de utilizarla para alterar el metabolismo de los ácidos orgánicos en trigo.

### 5.2. Transformación genética en trigo

Los recientes avances en el cultivo *in vitro* de cereales, junto al desarrollo de metodologías de transformación, han hecho realidad la ingeniería genética en trigo para mejorar parámetros de importancia agrícola e industrial, (Jahne *et al.*, 1996; Chen, 1998). La transformación genética en esta especie es una estrategia relativamente nueva, invaluable como complemento del mejoramiento genético convencional, siempre y cuando se disponga de genes de interés (Snape, 1996).

El procedimiento más exitoso de transformación genética en esta especie es el método de bombardeo de partículas o biobalística (Vasil *et al.*, 1992; Barcelo y Lazzeri, 1995). Las



células utilizadas corresponden a tejido embrionario que, debido a su activo crecimiento, prolifera rápidamente en un medio de inducción somática. A través de esta técnica, se han informado eficiencias de transformación fluctuantes entre 0,1 y 0,5% (Weeks *et al.*, 1993; Altpeter *et al.*, 1996) y 0,5% a 1,5% (Vasil *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1994; Nehera *et al.*, 1994). Si bien estos bajos porcentajes de eficiencia se obtuvieron con tejidos embriogénicos establecidos por periodos prolongados, hay considerable información que señala mejores resultados con tejidos embrionarios inmaduros y frescos (Nehera *et al.*, 1994). Recientes trabajos realizados en el CIMMYT sobre una gama de accesiones de trigo, informan eficiencias promedio de transformación entre 6 y 15% (CIMMYT, 2000), las más altas obtenidas a nivel mundial a la fecha. Estas metodologías estarán disponibles para el desarrollo del proyecto, como consecuencia de entrenamientos en transformación de trigo realizado en CIMMYT por uno de los investigadores del equipo técnico de esta propuesta.

**5.2.1. Genes de selección.** En cereales, la selección de células y plantas transformadas se ha realizado mediante genes de resistencia a herbicida y antibióticos (Wilmink y Dons, 1993). El gen *bar* es el de mayor uso en trigo, debido a que ha mostrado eficacia tanto en la obtención de plantas transgénicas homocigotas, como en la expresión estable del transgene. El gen *bar* codifica para la enzima fosfinothricin acetyltransferasa, y su introducción en plantas genera resistencia a través de la acetilación del herbicida fosfinothricin. El herbicida L-phosphinothricin (PPT o glufosinato) es un análogo de la glutamina, el cual inhibe la síntesis de la enzima glutamina sintetasa (GS), que participa en la asimilación de amonio (De Block *et al.*, 1997). La inhibición de GS causa la acumulación de amonio y con ello la muerte celular. PPT es químicamente sintetizado bajo el nombre comercial BASTA (Hoechst AG), o producido a través de *Streptomyces hygroscopicus*. Es por ello que el gen *bar* genera resistencia específica sólo a este herbicida.

**5.2.2. Promotores.** La selección de los promotores en la transformación genética de plantas es uno de los factores más importantes para obtener una expresión estable y específica del gen introducido. El promotor del gen de la ubiquitina (*Ubi-1*) (Christensen *et al.*, 1992) ha sido ampliamente usado en plantas monocotiledoneas (Cornejo *et al.*, 1993; Barcelo y Lazzeri, 1995; Stoger *et al.*, 1999), puesto que confiere un nivel de expresión 10 veces superior al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Christensen *et al.*, 1992). En consecuencia, el promotor del gen *Ubi-1* es el de elección para transgénesis en trigo, permitiendo expresar genes constitutivamente en todos los tejidos de la planta (Stoger *et al.*, 1999; Rooke *et al.*, 2000).

### 5.3. Fundamento fisiológico y metabólico de la propuesta

Para generar cultivares de trigo que exuden citrato en respuesta a la deficiencia de P, el proyecto utilizará la estrategia de incrementar la fijación autotrófica de carbono en raíces, mediante transgénesis con la proteína PEPC de lupino blanco. Mediante esta estrategia, se espera incrementar la concentración del substrato de la enzima citrato sintasa. Este substrato corresponde a oxaloacetato, el que puede ser directamente transportado hacia la mitocondria, o producido a través de la reducción del malato, el producto terminal de la glicólisis en plantas (Lance y Rustin, 1984) (Figura 1).

La posibilidad que el oxaloacetato sea preferentemente dirigido a la producción de malato, y no sea requerido como substrato en la mitocondria, se traduciría en la acumulación y subsecuente exudación de este ácido orgánico directamente desde el citosol. Aun cuando el



malato es utilizado como precursor para la síntesis de citrato en lupino blanco sometido a deficiencias de P (Neumann *et al.*, 1999; Peñaloza, 2001), plántulas de raps exudan preferentemente malato en respuesta a este estrés (Hoffland *et al.*, 1989, 1992). La constante de afinidad de malato por metales a los que frecuentemente se encuentra unido el P en suelos volcánicos ( $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ), es inferior a aquella que caracteriza a citrato (Jones, 1998), de manera que la habilidad de este ácido orgánico para movilizar P retenido en el suelo, sería inferior a citrato. Esta capacidad, sin embargo, finalmente dependerá de la cantidad de ácidos orgánicos posibles de ser exudados por las raíces (Neumann y Romheld, 2001).

Aun cuando el funcionamiento de la estrategia pudiera requerir adicionalmente la sobreexpresión de la enzima citrato sintasa, de modo de dirigir el oxaloacetato preferentemente para la producción de citrato, cálculos teóricos basados en el flujo de metabolitos indican que es improbable que la actividad de esta enzima limite la síntesis de citrato (Delhaize *et al.*, 2001). Estos resultados confirman estudios de sobreexpresión de la citrato sintasa de *Aspergillus niger* donde, no obstante aumentar 11 veces la actividad de la enzima, no se detectó incrementos en la concentración interna, ni en la exudación de citrato (Ruijter *et al.*, 2000). De acuerdo a estas evidencias, la sobreexpresión de la citrato sintasa parece no ser una estrategia que contribuya significativamente a la acumulación y exudación de citrato en plantas, a menos sostenidamente y por períodos prolongados.

La introducción del gen de la PEPC de lupino blanco en trigo, asume que el fosfoenolpiruvato (PEP) es suficiente tanto como sustrato de la enzima PEPC, así como para la síntesis de aminoácidos de los cuales este metabolito es su precursor. Si bien no se dispone de información sobre la concentración de PEP en raíces de trigo, se espera que la sobreexpresión de la enzima dirija la utilización del PEP preferentemente hacia la producción de oxaloacetato. La expresión constitutiva de la enzima con el promotor *Ubi-1* permitirá demostrar, en un grado extremo, el efecto de esta preferencia sobre otras rutas metabólicas que utilizan el mismo sustrato, y corresponde a parte del trabajo que se desarrollará en esta propuesta.

Desde una perspectiva funcional, se dispone de numerosas evidencias que indican que la enzima PEPC es activada por fosforilación. Dong *et al.* (1998) expresaron la enzima en raíces de maíz, demostrando que la fosforilación puede ocurrir mediante proteínas kinasas de animales, o extraídas desde hojas. Estos resultados indican que los mecanismos de activación de la PEPC mediante fosforilación, esencial para reducir la inhibición en la actividad de la enzima por efecto del malato (Chollet, 1996), no requiere de kinasas específicas. Por lo tanto, se espera que la actividad PEPC de lupino blanco no sea afectada por malato, una vez expresada en trigo.

En plantas transgénicas, el funcionamiento de la PEPC contribuirá a incrementar la disponibilidad de esqueletos carbonados, mediante la fijación autotrófica de carbono atmosférico, esperándose que esto se traduzca en la síntesis preferencial de citrato. En la mitocondria el citrato puede ser utilizado en el ciclo de Krebs para la generación de poder reductor, o transferido al citosol. En el citosol, este metabolito puede ser exudado en la rizósfera, o descarboxilado a isocitrato y luego a 2-ketoglutarato por las enzimas aconitasa citosólica e isocitrato dehidrogenasa, respectivamente (Figura 1). De acuerdo a las evidencias disponibles en lupino blanco y otras especies, la selectividad de esta preferencia se altera notablemente en plantas sometidas a la deficiencia de P, particularmente como consecuencia de la producción de  $H_2O_2$ . La producción de  $H_2O_2$  causa inhibición de la





enzima aconitasa y, consecuentemente, la acumulación de citrato en el citosol (Parsons *et al.*, 1999; Neumann *et al.*, 2001). Estas evidencias indican que la acumulación de citrato sería la consecuencia de factores asociados al estrés oxidativo que ocurre en plantas deficientes en P, y que afecta principalmente la actividad aconitasa. Del mismo modo, niveles fitotóxicos de cobre causan la acumulación de citrato, atribuido a la inhibición de la aconitasa citosólica (Murphy *et al.*, 1999). Una vez acumulado, el citrato es exudado en la rizósfera mediante un mecanismo de co-trasporte con  $K^+$  o  $H^+$ , cuando la concentración interna de este metabolito se acerca a niveles tóxicos para la célula (Murphy *et al.*, 1999; Neumann *et al.*, 2000).

Aun cuando no se dispone de evidencias sobre los efectos de la inactivación de la enzima aconitasa, estudios realizados en papa demostraron que 90% inhibición en la actividad de la enzima isocitrato dehidrogenasa citosólica (isocitrato a 2-ketoglutarato) mediante antisentido, provocó acumulación de citrato en plantas transgénicas de papa, sin efectos significativos sobre el metabolismo celular y el crecimiento de las plantas (Kruse *et al.*, 1998). Estos resultados indican que una eventual reducción en la actividad aconitasa citosólica por efecto de la acumulación de  $H_2O_2$ , no alteraría el sustrato necesario para síntesis de glutamato. Del mismo modo, y aun cuando la reducción en la actividad aconitasa mitocondrial pudiera eventualmente afectar el flujo de carbono a través del ciclo de Krebs, se ha demostrado que la inducción de la ruta respiratoria no fosforilante (oxidasa alternativa) es una importante adaptación de las plantas a la baja disponibilidad de P. Son precisamente estas adaptaciones metabólicas las que necesariamente deben ocurrir en plantas transformadas, de manera de ajustar su metabolismo al estrés, antes que se active la exudación de citrato, u otro ácido orgánico. Tales adaptaciones se favorecerían al introducir genes asociados con la tolerancia a la deficiencia de P, como los de lupino blanco, que se aislarán y evaluarán en este proyecto.

En la Figura 1 se esquematiza parte del ciclo del carbono en raíces, con el objetivo de puntualizar la ruta metabólica que se pretende modificar mediante transgénesis en este proyecto. En contraste a la transgénesis con la citrato sintasa, PEPC es una estrategia que se fundamenta en evidencias fisiológicas y metabólicas que la sugieren como una enzima de elección, si se pretende alterar el ciclo de los ácidos tricarbónicos a través de la acumulación y exportación de carbono en la rizósfera.





#### 5.4. Necesidad de promotores raíz-específicos y fósforo-específicos

Las plantas transgénicas sobreproductoras de citrato desarrolladas a la fecha, han utilizado la estrategia de sobreexpresión del transgen mediante promotores constitutivos (CaMV 35S). Aun cuando promotores de esta naturaleza son esenciales durante la fase experimental de un transgen, su expresión constitutiva provocaría un funcionamiento no modulado por el estrés, con un costo metabólico que pudiera no ser sostenible por la planta. Desde una perspectiva ambiental, la continua exudación de citrato se traduciría en una movilización permanente de P desde el suelo, así como de elementos como el manganeso, cuya absorción pudiera eventualmente llegar a niveles tóxicos para la planta. Bajo este razonamiento, la estrategia más racional para el desarrollo de plantas transgénicas que respondan sólo al estrés, consiste en la utilización de promotores raíz-específicos, y modulados por la disponibilidad de P. La disponibilidad de promotores específicos permitirá activar la expresión del transgen sólo en el tiempo y el tejido requerido, evitando la expresión constitutiva, energéticamente desfavorable y ambientalmente indeseable (Haran *et al.*, 2000).

De acuerdo a los antecedentes disponibles, no se han descrito promotores específicos de raíces en trigo, y que además, sean modulados por la disponibilidad de P. Existen pocos promotores de este tipo identificados en otras plantas. Recientemente se describió el promotor de una fosfatasa ácida en *Arabidopsis* inducido por bajos niveles de P, con fuerte expresión en raíces, pero también en hojas (Haran *et al.*, 2000). Este tipo de promotores ofrece una nueva herramienta molecular para dirigir la expresión de determinados genes en plantas, al responder a una simple señal química, fuertemente regulada por P, y con un bajo nivel de expresión basal. Existen, sin embargo, determinados genes que son regulados fuertemente por P, y cuya expresión ocurre preferentemente en raíces. Es el caso de genes que codifican para transportadores de P que pueden ser de utilidad para identificar promotores con las características deseadas.

Estudios de cinética del transporte de P en plantas y cultivos celulares indican la existencia de transportadores de alta afinidad funcionales a bajas concentraciones de P, y transportadores de baja afinidad que operan a altas concentraciones (Raghothama, 1999). El sistema de baja afinidad es aparentemente expresado constitutivamente, mientras que el sistema de alta afinidad es inducido bajo condiciones de deficiencia de fósforo, específicamente en las raíces de las plantas (Muchhal *et al.*, 1996; Muchhal y Raghothama, 1999; Smith *et al.*, 1997, 2000; Leggewie *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 1999). Los estudios indican que la transcripción de estos genes es regulado mediante señales sistémicas, que responden al estado interno de fósforo de la planta (Smith *et al.*, 2000). Los promotores de este tipo de genes son candidatos potenciales para evaluarlos en orden a dirigir la expresión del gen de interés de una manera tejido-específica y regulada por P. En trigo existe publicada una secuencia parcial de un cDNA correspondiente a un transportador de alta afinidad de fosfato, el cual se aisló de la variedad de trigo Chinese Spring. Esta secuencia puede ser utilizada para obtener la región promotora del gen, y evaluarla en trigo para determinar su capacidad de dirigir la expresión en forma tejido-específica y regulada por P, mediante fusión con genes reporteros



## 6. Presentación de la propuesta.

Sobre la base de lo expuesto, este proyecto se propone como parte de una línea de trabajo dirigida a mejorar la habilidad de los cultivos para acceder al P inorgánico retenido en suelos volcánicos de centro-sur y sur de Chile. En esta primera iniciativa se pretende introducir en trigo, genes de lupino blanco que le confieren a esta especie la capacidad para establecerse y crecer en suelos bajos en P disponible. Los esfuerzos se centrarán en el gen de la PEPC de lupino, con el objetivo de incrementar la síntesis, acumulación y exudación de ácidos orgánicos en la rizósfera. Para optimizar esta manipulación, se buscará un promotor que permita expresar el gen cuando y donde se le requiere; esto es, en raíces y modulado por la disponibilidad de P. Con este propósito, se buscarán promotores propios de trigo, particularmente el promotor de un gen que codifica para un transportador de alta afinidad de fosfato descrito en esta especie. Debido al tiempo requerido en este tipo de trabajos, en forma alternativa y para poder disponer de un promotor adecuado para los fines propuestos, se evaluará la funcionalidad de promotores ya identificados en otras especies como Arabidopsis.

La respuesta de las plantas a la deficiencia de P requiere el acondicionamiento de su metabolismo al estrés, lo que implica la activación de numerosos genes. Muchos de estos genes, sin embargo, forman parte del sistema de rescate generalizado en plantas y, por lo tanto, necesariamente deben expresarse en condiciones de deficiencia de P en trigo. De este modo, la exudación de ácidos orgánicos correspondería a un mecanismo adicional, que le permitiría a la especie movilizar el P retenido en el suelo. En la eventualidad que así no ocurra, una parte importante de las actividades a realizar en el proyecto considera la identificación y caracterización de una gran parte de los genes que se expresan en tejidos radicales que exudan citrato en respuesta a la deficiencia de P en lupino blanco. Dichos genes podrían eventualmente ser introducidos en trigo, en forma adicional a PEPC, de manera de potenciar la capacidad de acceder al P retenido en el suelo. Basado en su identidad y probable función fisiológica, tres de estos genes serán introducidos a trigo en este proyecto, con el propósito de evaluar su contribución a la adaptación de la planta a suelos bajos en P disponible.

Adicionalmente, el desarrollo de este proyecto permitirá implementar en el país la tecnología de transformación genética de trigo. Una vez disponible, sería posible mejorar otros aspectos agronómicos en esta especie mediante esta tecnología. Se espera que, como consecuencia de la exudación de ácidos orgánicos en la rizósfera, las plantas puedan tolerar más eficientemente la deficiencia de P, y eventualmente la presencia de aluminio fitotóxico, otro problema agronómico de magnitud en los suelos volcánicos del centro-sur y sur del país.

Esta propuesta representa un enfoque innovativo para acceder al P retenido en los suelos, e involucra estudios fisiológicos, metabólicos, moleculares y citogenéticos, de modo de enfrentar el problema mediante una estrategia integrada. La estrategia propuesta es susceptible de patentamiento, así como los genes y promotores que se descubran. Se pretende que el desarrollo del proyecto ubique al país y a la IX Región en una posición de liderazgo del mejoramiento del trigo mediante la ingeniería genética, desafío que será enfrentado interdisciplinaria e inter-institucionalmente.



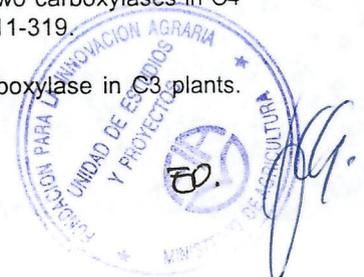
## Referencias

- Altpeter, F., Vasil, V., Srivastava, V., Stoger, E. y Vasil, I.K. 1996. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Plant Cell Rep.* 16:12-17.
- Barcelo, P. y Lazzeri, P.E. 1995. Transformation of cereals by microprojectile bombardment of immature inflorescence and scutellum tissues. In Jones H. (Ed.). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 49, plant gene transfer and expression protocols. Humana Press. Totowa, N.J. pp 113-123.
- Becker, D., Brettschneider, R. y Lorz, H. 1994. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *Plant J.* 5: 299-307.
- Benning, C. 1998. Biosynthesis and function of the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:53-75.
- Besoain, E. 1999. Los suelos volcánicos y la fertilización fosfatada. En: Besoain, E., Rojas, C. y Montenegro, A. (Eds.). *Las Rocas Fosfóricas y sus Posibilidades de Uso Agrícola en Chile*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura, pp. 13-21.
- Beaujean, A., Issakidis-Bourguet, E., Catterou, M., Dubois, F., Sangwan, R.S. y Sangwan-Norreel, B.S. 2001. Integration and expression of sorghum C4 phosphoenolpyruvate carboxylase and chloroplastic NADP(+) malate dehydrogenase separately or together in C3 potato plants. *Plant Sci.* 160:1199-1210.
- CIMMYT, 2000. CIMMYT in 1999-2000. Science and Substance. Mexico D.F.: CIMMYT. ISSN:0188-9214.
- Chen, D-F. 1998. Genetic transformation of wheat. In: Foster, G.D. y Taylor, S.C. (Eds). *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc, Totowa, NJ, pp. 373-382.
- Christensen, A.H., Sharrock, R.A. y Quail, P.H. 1992. Maize polyubiquitin genes: Genes, structure, termal perturbation of expresion and transcript splicing, and promoters activity following transfer to protoplast by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689.
- Chollet, R. 1996. Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:273-298.
- Cornejo, M.J, Luth, D., Balkenship, K.M., Anderson, O.D. y Blechl, A.E. 1993. Activity of a maize ubiquitin promotor in transgenic rice. *Plant Mol. Biol.* 23: 567-581.
- De Block, M., Debrouwer, D. y Moens, T. 1997. The development of a nuclear male sterility system in wheat: Expression of the bar gene under the control of tapetum specific promoters. *Theor Appl Genet.*, 95:125-131.
- De la Fuente, J.M., Ramírez-Rodríguez, V., Cabrera-Ponce, J.L. y Herrera-Estrella, L. 1997. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276:1566-1568.
- Delhaize, E., Hebb, D.M. y Ryan, P.R. 2001. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated wirth either anhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol.* 125:2059-2067.
- Dinkelaker, B., Hengeler, C. y Marschner, H. 1995. Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. *Bot. Acta* 108:183-200
- Dong, L.Y., Masuda, T., Kawamura, T., Hata, S. y Izui, K. 1998. Cloning, expression, and characterization of root-form phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*: comparison with the C4-form enzyme. *Plant Cell Physiol.* 39:865-873.
- Dong, B., Ryan P.R., Rengel, Z., y Delhaize, E. 1999. Phosphate uptake in *Arabidopsis thaliana*: dependence of uptake on the expression of transporter genes and internal phosphate concentrations. *Plant Cell Env.* 22:1455-1461.





- Gardner, W.K., Barber, D.A. y Parbery, D.G. 1982. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. II. The effect of varying phosphorus supply and soil type on some characteristics of the soil/root interface. *Plant Soil* 68:33-41.
- Gehlen, J., Panstruga, R., Smets, H., Merkelbach, S., Kleines, M., Porsch, P., Fladung, M., Becker, I., Rademacher, T., Hausler, E. y Hirsch, H.J. 1996. Effects of altering phosphoenolpyruvate carboxylase activities on transgenic C3 plant *Solanum tuberosum*. *Plant Mol. Biol.* 32:831-848.
- Haran, S., Logendra, S., Seskar, M., Bratanova, M. y Raskin, I. 2000. Characterization of Arabidopsis acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression. *Plant Physiol.* 124:615-626.
- Hoffland, E., van der Boogaard, R., Nelemans, J. y FINDERNEGG, G. 1992. Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants. *New Phytol.* 122:675-680.
- Jahne, A., Becker, D. y Lorz, H. 1996. Genetic engineering of cereal crops: A review. *Euphytica*, 85:37-42.
- Johnson, J.F., Allan, D.L. y Vance, C.P. 1994. Phosphorus stress-induced proteoid roots shows altered metabolism in *Lupinus albus*. *Plant Physiol.* 104:657-665.
- Johnson, J.F., Allan, D.L., Vance, C.P. y Weiblen, G. 1996. Root carbon dioxide fixation by phosphorus-deficient *Lupinus albus*. Contribution to organic acid exudation by proteoid roots. *Plant Physiol.* 112:19-30.
- Jones, D.L. 1998. Organic acids in the rhizosphere-a critical review. *Plant Soil* 205:25-44.
- Koyama, H., Kawamura, A., Kihara, T., Takida, E. y Shibata, D. 2000. Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus limited soil. *Plant Cell Physiol.* 41:1030-1037.
- Kruse, A., Fieuw, S., Heineke, D. y Muller-Rober, B. 1998. Antisense inhibition of cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in transgenic potato plants. *Planta* 205:82-91.
- Ku, M.S., Agarie, S., Nomura, M., Fuyakama, H., Tsuchida, H., Ono, K., Hirose, S., Toki, S., Miyao, S. y Matsuoka, M. 1999. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nat. Biotechnol.* 17:22-23.
- Lance, C. y Rustin, P. 1984. The central role of malate in plant metabolism. *Physiol. Veg.* 22:625-641.
- Leggewie, G., Willmitzer, L. y Reismeyer, J.W. 1997. Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: identification of phosphate transporter from higher plants. *Plant Cell* 9:381-392.
- Liu, Ch., Muchhal, U. S., Uthappa, M., Kononowicz, A. K., y Raghothama, K.G. 1998. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol* 116:91-99.
- Lyon, R., Mahoney, M., Yonglin, D., Lidgett, A., Pallaghy, C. y Spangenberg, G. 2000. Molecular Breeding of Forage Crops. Second International Symposium. Victoria, Australia, pp. 79.
- López-Bucio, J., Martínez de la Vega, O., Guevara-García, A. y Herrera-Estrella, L. 2000. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat. Biotech.* 18:450-453.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Second Edition. Academic Press, London.
- Massonneau, A., Langlade, N., Leon, S., Smutny, J., Vogt, E., Neumann, G. y Martinoia, E. 2001. Metabolic changes associated with cluster root development in white lupin (*Lupinus albus* L.): relationship between organic acid excretion, sucrose metabolism and energy status. *Planta* 213:534-542.
- Matsuoka, M., Kyojuka, J., Shimamoto, K. y Kano-Murakami, Y. 1994. The promoters of two carboxylases in C4 plant (maize) direct cell-specific, light-regulated expression in a C3 plant (rice). *Plant J.* 6:311-319.
- Melzer, E. y O'Leary, M.H. 1987. Anapleurotic CO<sub>2</sub> fixation by phosphoenolpyruvate carboxylase in C3 plants. *Plant Physiol.* 84:58-60.





- Montenegro, A., Besoain, E., Vera, L. y Mendez, E. 1999. Evaluación de la roca fosfórica de Bahía Inglesa en suelos del sur de Chile en condiciones de invernadero. En: Besoain, E., Rojas, C. y Montenegro, A. (Eds.). Las Rocas Fosfórica y sus Posibilidades de Uso Agrícola en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura, pp. 177-189
- Muchhal, U.S., Pardo, J.M., y Raghothama, K.G. 1996. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl Acad Sci USA 93:10519-10523.
- Muchhal, U.S., y Raghothama, K.G. 1999. Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. Proc. Natl Acad Sci USA 96:5868-5872.
- Murphy, A.S., Eisinger, W.R., Shaff, J.E., Kochian, L.V. y Taiz, L. 1999. Early cooper-induced leakage of  $K^+$  from *Arabidopsis* seedlings is mediated by iron channels and coupled to citrate efflux. Plant Physiol. 121:1375-1382.
- Nehera, N., Chibbar, R.N., Leung, N., Caswell, K., Mallard, C., Steinhauer, L., Baga, M. y Kartha, K.K. 1994. Self fertile transgenic wheat plant regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs. Plant Journal, 5: 285-297.
- Neumann, G., Massonneau, A., Martinoia, E. y Romheld, V. 1999. Physiological adaptation to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. Planta 208:373-382.
- Neumann, G., Massonneau, A., Langlsde, N., Dinkelaker, B., Hengeler, C., Romheld, V. y Martinoia, E. 2000. Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus-deficient white lupin (*Lupinus albus* L.). Ann. Bot. 85:909-919
- Neumann, G., y Romheld, V. 2001. The release of root exudates as affected by the plant's physiological status. In: Pinton, R. y Nannipieri, P. (Eds.), The Rhizosphere, Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface. Marcel Dekker, New York, pp.41-93.
- Parsons, H.L., Yip, J.Y.H. y Vanlerberghe, G.C. 1999. Increase respiratory restriction during phosphate-limited growth in transgenic tobacco cells lacking alternative oxidase. Plant Physiol. 121:1309-1320.
- Peñaloza, E., Carvajal, N., Corcuera, L. y Martínez, J. 2000. Exudación de citrato y actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en raíces de lupino blanco, en respuesta a variaciones en la disponibilidad de fósforo. Agricultura Técnica 60:89-98.
- Peñaloza, E., Corcuera, J.L. y Martínez, J. 2001. Spatial and temporal variation in citrate and malate efflux and tissue concentration as affected by P-stress in roots of white lupin. Plant Soil (aceptado)
- Pino, I., Luzio, W. y Parada, A.M. 1998. Cinética de intercambio isotópico en suelos derivados de cenizas volcánicas. Un modelo predictivo. Agricultura Técnica 58:56-65.
- Plaxton, W.C. 1998. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. In: Lynch, J. P y Deikman, J. (Eds.). Regulatory Roles in Molecular Cellular Organismic, and Ecosystem Processes. pp.229-241.
- Raghothama, K.G. 1999. Phosphate acquisition. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50:665-693.
- Raghothama, K.G. 2000. Phosphorus acquisition; plant in the driver's seat!. Trends Plant Science 5(10): 412-413
- Rooke, L., Byrne, D. y Salgueiro, S. 2000. Marker gene expression driven by the maize ubiquitin promoter in transgenic wheat. Ann. Appl. Biol. 136:167-172.
- Ruijter, G., Panneman, H., Xu, D.B. y Visser, J. 2000. Properties of *Aspergillus niger* citrate synthase and effects of overexpression on citric acid production. FEMS Lett. 184:35-40.
- Ryan, P.R., Delhaize, E. y Randall, P.J. 1995 a. Malate efflux from root apices and tolerance to aluminium are highly correlated in wheat. Aust. J. Plant Physiol. 22:531-536.
- Ryan, P.R., Delhaize, E. y Randall, P.J. 1995 b. Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. Planta 196:102-110.





- Snape, J.W. 1996. The contribution of new biotechnologies of wheat breeding. In: Reynolds, M.P., Rajaram, S. McNab, A. (Eds.). *Increasing Yield Potential in Wheat: Breaking the Barriers*. Mexico, D.F.: CIMMYT, pp. 167-181.
- Stevens, T. 1997. Riding the phosphorus bank. *Rural Research* 174:13-16
- Stoger, E., Williams, S., Keen, D. y Christou, P. 1999. Constitutive versus seed specific expression in transgenic wheat: Temporal and spatial control. *Transgenic Research*, 8:73-82.
- Sepúlveda, G., Besoain, E. y Molina, R. 1999. Eficiencia agronómica de rocas fosfóricas nacionales y sus posibilidades de uso como fertilizantes fosfatados en suelos volcánicos ácidos de la IX Región. En: Besoain, E., Rojas, C. y Montenegro, A. (Eds.). *Las Rocas Fosfóricas y sus Posibilidades de Uso Agrícola en Chile*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura, pp.140-155
- Smith, F.W., Ealing, P.M., Dong., B. y Delhaize, E. 1997. The cloning of two Arabidopsis genes belonging to a transporter family. *Plant J.* 11:83-92.
- Smith F.W., Rae, A.L., y Hawkesford, M.J. 2000. Molecular mechanisms of phosphate and sulphate transport in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:236-245.
- Theodorou, M.E. y Plaxton, W.C. 1993. Metabolic adaptation of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol.* 101:339-344.
- Tilmann, D. 1999. Global environmental impact of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proc. Natl. Acad. Sc.* 96:5995-6000
- Tysdale, S.L., Nelson, W.L. y Beaton, J.D. 1975. *Soil Fertility and Fertilizers*. Fourth Edition. McMillan Publishing Company, New York.
- Vasil, V., Srivastava, V., Castillo, A.M., Fromm, M.E. y Vasil, I.K. 1993. Rapid production of transgenic wheat plant by direct bombardment of fertile transgenic plants. *Bio/Technology*, 11:667-674.
- Vasil, V., Castillo, A.M., Fromm, M.E., y Vasil, I.K. 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of a regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology*, 10:1553-1559.
- Weeks, J.T. Anderson, O.D. y Blechl, A.E. 1993. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiology* 102: 1077-1084
- Wilmink, A. y Dons, J.J.M. 1993. Selective agents and markers gene for use in transformation of monocotyledonous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11:165-185.
- Yan, X., Liao, H., Trull, M.C., Beebe, S.E. y Lynch, J.P. 2001. Induction of mayor leaf acid phosphatase does not confer adaptation to low phosphorus availability in common bean. *Plant Physiol.* 125:1991-1911.





## 6. MARCO GENERAL DEL PROYECTO

### Oferta y demanda de fertilizantes fosfatados en Chile

La demanda de fertilizantes fosfatados ( $P_2O_5$ ) se ha incrementado sostenidamente durante las dos últimas décadas en el país, desde 46.000 Ton el año 1975 a 150.000 Ton el año 1998 (Rojas, 1998). De acuerdo a la distribución regional del consumo de este nutriente, se estima que alrededor del 95% se utiliza entre la VII y IX regiones (Martínez *et al.*, 1983) (Cuadro 1). Entre los cultivos anuales y praderas, el trigo es la especie de mayor demanda de fertilizantes fosfatados, representando el 38,2% del total utilizado en Chile (INIA, 1989). Extrapolando esta información a la zona de influencia de la propuesta, se estima que la demanda mínima de consumo de P por este cultivo en el centro-sur y sur, representó aproximadamente el 32,8% del consumo nacional en el año 2000 (Cuadro 1). Esta demanda es actualmente suplida mediante la importación, que en la actualidad involucra un gasto anual de alrededor de US\$ 35 millones. Debido a procesos de fijación, aproximadamente US\$ 20 millones quedan retenidos en el suelo, no disponibles para los cultivos.

Otras opciones de fertilizantes fosfatados, representadas principalmente por aquellas derivados de rocas fosfóricas, no son alternativa para cultivos anuales debido a su lenta solubilidad. La baja solubilidad de las rocas fosfóricas puede mejorarse notablemente en presencia de plantas que exuden ácidos orgánicos en la rizósfera, como el lupino blanco. De esta forma, la estrategia propuesta permitiría a las plantas utilizar las rocas fosfóricas como fuente de fósforo, de manera similar a como lo hacen especies que utilizan la estrategia de exudar ácidos orgánicos para acceder al P retenido en los suelos. Esto pudiera contribuir un eventual incremento en la producción de fertilizantes fosfatados nacionales, que en la actualidad no representan más de 5.000 Ton anuales (FAO, 1998)

Cuadro 1. Superficie y consumo de fosfato ( $P_2O_5$ ) por el cultivo del trigo en la zona centro-sur y sur de Chile

Regiones	Consumo total $P_2O_5$ (% nacional)	Consumo regional $P_2O_5$ (Ton)	Superficie regional de trigo (ha)	Consumo estimado $P_2O_5$ en trigo (Ton)	Consumo estimado $P_2O_5$ en trigo (% nacional)
VII	6,0	9.300	65.000	3.553	2,3
VIII	19,3	29.915	111.600	11.428	7,4
IX	30,8	47.740	166.970	18.237	11,8
X	29,8	46.190	29.850	17.645	11,4
Subtotal	85,9	133.145	373.420	50.861	32,8
Total nacional		155.000 <sup>(1)</sup>	414.000		

Fuente: Adaptado de Martínez *et al.*(1983), Silva (1989) y ODEPA (2001)

(1) Estimado año 2000





## El trigo y su ambiente de producción

Los suelos arables del país comprenden alrededor de 5,4 millones de ha, de las cuales 2,8 millones se ubican entre la VII y X regiones. El 73% de esta superficie corresponde a suelos volcánicos, cuya incidencia representa el 62,7, 65,7, 95,0 y 86,0%, en las regiones VII, VIII, IX y X, respectivamente (Cuadro 2). Esta situación genera un conflicto agronómico de magnitud para los cultivos que se desarrollan en esta área geográfica puesto que, unido a la alta retención de P que ocurre en suelos volcánicos, se agregan los problemas derivados de la toxicidad por aluminio que los caracteriza.

Cuadro 2. Superficie arable (en ha) cubierta por suelos volcánicos en el centro-sur y sur de Chile

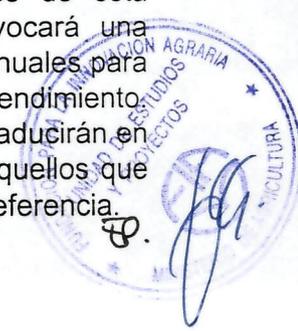
Regiones	Superficie Total	Suelos arables <sup>1</sup>	Superficie arable cubierta por suelos volcánicos
VI	2.110.400	314.800	197.442
VIII	4.542.100	760.300	499.407
IX	3.247.200	704.900	670.392
X	7.292.800	988.500	854.828

Fuente: Adaptado de Besoain (1999).

<sup>1</sup>Corresponde a cultivos anuales y praderas

Una alta proporción de los suelos que caracterizan al área de influencia del proyecto está representada por explotaciones de pequeños agricultores, lo que extiende el conflicto agronómico a un problema socio-económico. El problema socio-económico es de particular magnitud en la IX Región, caracterizada por una alta proporción de población mapuche. De acuerdo a la última encuesta agropecuaria, existen 57.800 explotaciones dedicadas a trigo en la pequeña agricultura, representando el 65% del total de explotaciones con este cultivo. En éstas, la superficie de siembra fluctúa entre 0,4 y 2,1 ha, contribuyendo con el 15,5% de la producción nacional. Para un rendimiento nacional de 35 qqm/ha, el rendimiento promedio de estos agricultores es inferior a 20 qqm/ha, lo que ofrece la posibilidad de reducir esta brecha mediante la introducción de nuevas tecnologías, sin costo adicional. Nuevos cultivares de trigo con eficiencia para movilizar el P retenido en el suelo permitirán un uso más eficiente de los bajos niveles de fertilizantes utilizados por este estrato de la agricultura.

Los beneficios de esta nueva tecnología podrán también ser utilizados por explotaciones medianas y grandes, con un impacto económico significativo. En efecto, si se considera que alrededor de 280.000 ha cultivadas con trigo corresponden a explotaciones de esta naturaleza, la reducción en la fertilización fosfatada de solo el 10%, provocará una disminución en la demanda de fósforo de aproximadamente 2.800 Ton de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> anuales para un nivel de fertilización de 100 kg/ha P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, sin efectos negativos sobre el rendimiento. Incrementos en la movilización del P retenido en el suelo, por sobre el 10%, se traducirán en reducciones proporcionales en el uso de este insumo, de mayor magnitud en aquellos que normalmente utilizan dosis de fertilización fosfatada superior a la utilizada como referencia.





Debido a las constantes de afinidad de ciertos ácidos orgánicos por aluminio fitotóxico ( $Al^{3+}$ ), la estrategia propuesta no solo permitirá movilizar el P retenido en el suelo, sino también quelar el  $Al^{3+}$  en la rizósfera, impidiendo que éste penetre en la planta. Este efecto directo de los ácidos orgánicos ofrece una ventaja económica y ambiental adicional, que pudiera eventualmente traducirse en reducción de los niveles de encalado frecuentemente utilizados para la producción de cultivos en suelos volcánicos con pH inferior a 5,5.

## Referencias

Besoain, E. 1999. Los suelos volcánicos y la fertilización fosfatada. En: Besoain, E., Rojas, C. y Montenegro, A. (Eds.). Las Rocas Fosfóricas y sus Posibilidades de Uso Agrícola en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura, pp. 13-21.

FAO. 1998. Anuario de Fertilizantes, vol 48.

Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA. 1989. Impacto de los fertilizantes en la productividad agrícola. INIA, Serie La Platina N° 14, Santiago, 247 p.

Martínez, F., Aldunate, P. y Muchnik, E. 1983. Estudio de los mercados de fertilizantes, pesticidas, productos veterinarios y semillas. Depto. Economía Agraria, Pontificia Universidad Católica de Chile, 189 p.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, ODEPA. 2001. Estadísticas Agropecuarias, Departamento de Información Agraria, Ministerio de Agricultura (<http://www.odepa.gob.cl>).

Rojas, V. 1998. Evolución y Perspectivas de Mercado de Fertilizantes en la Agricultura Chilena para el Período 1975-1997. Tesis de Grado, Universidad Mayor, Santiago.

Silva, N.B. 1989. Los fertilizantes y la producción agrícola. En: Impacto de los Fertilizantes en la Producción Agrícola. INIA, Serie La Platina N° 14, pp. 23-45.





## 7. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL PROYECTO

El proyecto se ejecutará en el Centro Regional de Investigación Carillanca (INIA), comuna de Vilcún, IX Región, ubicado en el área rural, a 25 km de la ciudad de Temuco, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, Santiago, y en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Depto. de Botánica de la Universidad de Concepción, Concepción.





## 8. OBJETIVOS DEL PROYECTO

### 8.1. GENERAL:

Integrar genes de lupino en el genoma del trigo mediante biobalística, con el propósito de desarrollar nuevas variedades con habilidad para movilizar el fósforo inorgánico retenido en los suelos del centro-sur y sur de Chile

### 8.2. ESPECÍFICOS:

1. Aislar y caracterizar genes asociados con la exudación de citrato en *L. albus*
2. Identificar promotores funcionales en trigo, específicos de raíces, y modulados por la disponibilidad de fósforo
3. Optimizar la transformación genética de variedades elite de trigo chilenas mediante biobalística
4. Evaluar la funcionalidad en trigo, de promotores aislados desde *Arabidopsis* y trigo
5. Transformar trigo con el gen de la PEPC de *L. albus*
6. Transformar trigo con otros genes de *L. albus*



## 9. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS

### OBJETIVO ESPECIFICO N° 1. Aislar y caracterizar genes asociados con la exudación de citrato en *L. albus*

La identificación de genes que se expresan en tejidos que exudan citrato en respuesta a la deficiencia de P se realizará mediante la técnica del “differential display” de ARN mensajeros (Liang y Pardee, 1992; Liang *et al.*, 1993). El ARN se obtendrá desde raicillas proteoideas, estructuras radicales especializadas en la función de excreción de citrato en lupino blanco. Puestos que estas estructuras son inducidas sólo en ausencia de P, el tejido contrastante en exudación corresponderá a raicillas proteoideas rescatadas de la deficiencia de P mediante la incorporación de 0,1 mM P, una vez que las plantas han desarrollado abundantes raíces proteoideas (Peñaloza *et al.*, 2001)

#### Actividad 1.1. Diseño y construcción de partidores.

En este estudio se utilizarán 3 oligo-dT y 25 partidores arbitrarios, lo que permitirá analizar 75 combinaciones para cada muestra de ARN. Cada combinación de partidores permitirá visualizar aproximadamente 80 bandas, de manera que se analizarán aproximadamente 6000 mRNAs. Este estudio se complementará con los aproximadamente 1.500 mRNA analizados previamente. Los partidores serán de 16 bases, y se diseñarán con un sitio HindIII en el extremo 5'

#### Actividad 1.2. Crecimiento de plantas y extracción de ARN.

El ARN total se extraerá desde raíces de plantas mantenidas en solución nutritiva pH a 5,8 (Peñaloza *et al.*, 2001). El tejido se cosechará a los 25 y 27 días después del trasplante (DDT) a la solución nutritiva, desde plantas mantenidas en ausencia de P (P0), y desde plantas rescatadas de la deficiencia mediante la incorporación de 0,1 mM P a los 24 DDT (P1). El ARN se extraerá con la solución de Chomczynski con fenol (Winkler), de acuerdo a las recomendaciones del distribuidor. Para la eliminación del ADN cromosomal, el ARN total se tratará con inhibidor de ribonucleasas (rRNasin) Se cuantificará el RNA extraído, verificándose su integridad y la eliminación del DNA cromosomal mediante geles de agarosa-formaldehido (Sambrook *et al.*, 1989).

#### Actividad 1.3. “Differential display” de ARN mensajeros.

La transcripción reversa de ARN mensajeros se realizará con ARN total, en presencia de cada uno de los 3 oligo-dT radiactivo, utilizando SuperScript II Rnase H<sup>-</sup> reversa transcriptasa (Gibco BRL), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los oligo-dTs se fosforilarán con  $\gamma^{32}$ [P] ATP (NEN Life Science Products) y T4 polinucleotido kinas, de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Gibco BRL).





Para la amplificación por PCR, los productos de la transcripción reversa de cada oligo-dT se dividirán en 25 fracciones, a las cuales se agregará el partidor arbitrario correspondientes (25 partidores). Se amplificarán los productos de la transcripción de los tratamientos: P0-25 DDT, P0-27 DDT, P1-25 DDT y P1-27 DDT. Una alicuota de los productos amplificados se denaturarán y resolverán en geles de secuenciación. El gel se expondrá húmedo a un film de autoradiografía (KODAX MR) a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La autoradiografía se alinearé con el gel, cortándose las bandas de interés a través del film. El DNA se eluirá a  $100^{\circ}\text{C}$ , y se recuperará según Liang *et al.* (1993).

#### **Actividad 1.4. Reamplificación de productos diferenciales.**

Los fragmentos de cDNA eluidos desde geles se reamplificarán por PCR. Los productos de la reamplificación se visualizarán en geles de agarosa, tanto para confirmar la amplificación de productos del tamaño esperado, como para recuperar las bandas de interés. El cDNA se purificará desde los fragmentos de agarosa mediante el kit QIAGEN, y se determinará su concentración.

#### **Actividad 1.5. Clonamiento de productos diferenciales.**

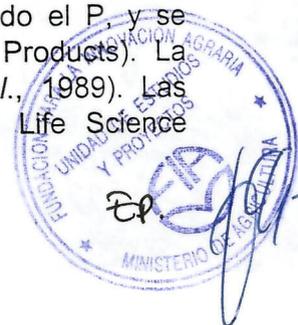
Los cDNA purificados desde geles de agarosa se ligarán al vector pGEM-T (Promega) y se clonarán en células competentes de *E. coli* JM109, de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Debido a que un producto diferencial puede representar una mezcla de cDNAs comigrantes, se seleccionarán seis clones por producto diferencial. La presencia del inserto en cada clon se comprobará mediante digestión del plasmidio con HindIII.

#### **Actividad 1.6. Secuenciación y homología de secuencias.**

Los plasmidios que contienen el inserto de tamaño esperado serán purificados, y secuenciados. Para la secuenciación se utilizará el kit Big Dye terminator (Perkin Elmer), y los partidores universales M13, realizándose en un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Perkin Elmer). Con el propósito de identificar homología con secuencias conocidas, se utilizará el servidor NCBI algoritmo BLAST.

#### **Actividad 1.7. Verificación de productos diferenciales mediante "Northern blot"**

Los fragmentos purificados se marcarán radiactivamente con  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP mediante el kit de partidores al azar (Promega), según las instrucciones del fabricante. Estas sondas se utilizarán para verificar los productos supuestamente diferenciales, mediante "Northern blot". El "Northern" se realizará con ARN total extraído desde raicillas proteideas de plantas mantenidas en ausencia de P, y rescatadas de la deficiencia a los 24 DDT. Utilizando como referencia 24 DDT, el ARN se extraerán a las 0, 8, 24 y 72 h de agregado el P, y se transferirá a membranas de nylon GeneScreen Plus (NEN Life Science Products). La hibridación de las membranas se realizará de acuerdo a Sambrook *et al.*, 1989). Las membranas se regenerarán según las instrucciones del fabricante (NEN Life Science Products).





### Actividad 1.8. Construcción de una genoteca de cDNA de *L. albus*.

La fuente de los RNA a partir de la cual se construirá la genoteca serán las raicillas proteoideas. Estas se producirán bajo las condiciones descritas en el punto 1.2.. La extracción de RNA total se realizará utilizando el sistema RNeasy (QIAGEN), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA purificado se le determinará su calidad y su concentración mediante absorbancia a 280 nm (Sambrook *et al.*, 1989). Posteriormente, el RNA mensajero será purificado a partir del RNA total anterior utilizando el sistema oligotex (QIAGEN), el cual se basa en la selección del RNA poliadenilado por medio de una resina de oligo-dT.

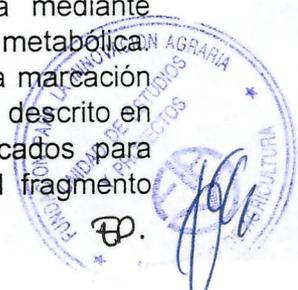
Para la síntesis del cDNA se utilizarán 3 µg de RNA poliadenilado previamente cuantificado, purificado, y resuspendido en 5 µL agua libre de RNAsas (tratada con DEPC) (Sambrook *et al.*, 1989). La síntesis de cDNA se realizará usando el sistema "Superscript Lambda System" (Gibco BRL). El cDNA resultante se cuantificará en una placa de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989). Las moléculas de cDNA resultantes son doble hebra, a las cuales se les ha introducido extremos cohesivos que permiten ligarlos direccionalmente en el vector de expresión lambda/ZipLox (Gibco BRL). Este vector tiene la ventaja de expresar la proteína correspondiente al cDNA clonado, lo que eventualmente facilitaría la búsqueda de genes a través de inmunoscreening. El DNA del fago recombinante obtenido será empaquetado con sus proteínas de cubierta usando el sistema de empaquetamiento Packagene Extract (Promega), tal como recomienda el fabricante. Los fagos obtenidos se plaquearán utilizando la cepa de *E. coli* suministrada por el kit Gibco BRL, de modo de determinar el título de la genoteca.

### Actividad 1.9. Aislamiento del cDNA que codifica para PEPC.

Se dispone de un fragmento de 300 pares de bases del extremo 3' de la PEPC de lupino blanco, el cual está clonado en pGEM-T. Este fragmento se liberará del plasmidio mediante restricción, aislará, y purificará para ser marcado radiactivamente con  $\alpha^{32}\text{[P]-dCTP}$  mediante el kit de partidores al azar (Promega). El fragmento será posteriormente utilizado como sonda en hibridaciones con la genoteca obtenida en el punto 1.8. Una vez identificados los clones de fagos positivos, estos serán escindidos *in vivo* mediante infección de la cepa de *E. coli* HB10B (provisto en el sistema Gibco BRL), transformándolos a la forma plasmidial en pSORT1. Los plasmidios de los clones de interés serán purificados para secuenciar el cDNA y verificar por homología su identidad como PEPC.

### Actividad 1.10. Aislamiento de cDNAs que codifican para otros genes regulados por fósforo en *L. albus*.

Utilizando la metodología descrita en la actividad anterior, se aislará el cDNA de largo completo de 3 genes que se expresen en respuesta a la deficiencia de P, obtenidos en el punto 1.6. La selección se realizará de acuerdo a su identidad obtenida mediante comparación de secuencias en las bases de datos (NCBI), y probable función metabólica. Los fragmentos serán liberados mediante digestión del plasmidio con HindIII. La marcación de los fragmentos y escrutinio de la genoteca se realizará de manera similar a lo descrito en la actividad anterior. Los plasmidios de los clones de interés serán purificados para secuenciar el cDNA. Esta información será comparada con la secuencia del fragmento



utilizado como sonda para comprobar la identidad del clon obtenido. La secuencia completa del cDNA obtenido se comparará con las bases de datos a través del algoritmo BLAST en el servidor NCBI (BLASTnr y BLASTest), de modo de comprobar su homología con genes ya identificados.

## **OBJETIVO ESPECIFICO N° 2. Identificar promotores funcionales en trigo, específicos de raíces, y modulados por la disponibilidad de fósforo**

### **Actividad 2.1. Aislar promotoras de los genes AtPT1 y AP de *A. thaliana*.**

Se aislarán promotores de los genes que codifican para transportadores de fosfato de alta afinidad (AtPT1), y para la enzima fosfatasa alcalina (AP) de *Arabidopsis thaliana*. Basados en el hecho que las secuencias genómicas de los genes transportadores de fosfato en *A. thaliana* han sido descritas (Okumura *et al.*, 1998; Daram *et al.*, 1999), al igual que el de AP (Haran *et al.*, 2000), y que el genoma de *Arabidopsis* ha sido secuenciado (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), se utilizarán dichas secuencias para obtener partidores que permitan amplificar por PCR las correspondientes regiones promotoras. Como los proyectos de secuenciación de diferentes especies que se están actualmente desarrollando, durante la ejecución de la propuesta permanentemente se buscarán nuevas secuencias en las bases de datos.

**Actividad 2.1.1. Amplificar el promotor de los genes AtPT1 y AP de *A. thaliana*.** Basados en las secuencias publicadas de los genes mencionados, se diseñaran partidores de PCR para amplificar los genes AtPT1 y AP de *Arabidopsis*. Las condiciones de amplificación se manejarán de modo de obtener un producto único.

**Actividad 2.1.2. Clonamiento y secuenciación de los promotores amplificados.** Una vez amplificados, los fragmentos se clonarán en el vector pBluescript, según técnicas descritas en Sambrook *et al.* (1989). Los fragmentos se secuenciarán tanto para verificar identidad del promotor, como la ausencia de mutaciones introducidas durante la amplificación por PCR.

**Actividad 2.1.3. Contrucción de fusiones entre los promotores AtPT1 y AP, y el gen reportero *gus*.** El uso de fusiones de regiones promotoras con genes reporteros es una buena aproximación para estudiar patrones de expresión de un gen en particular (Seitz *et al.*, 2000). Para verificar la expresión del gen de interés, así como también el lugar de expresión, se construirán fusiones al gen reportero *gus* (Shah y Klessig, 1996). Las construcciones se realizarán en el plásmido pACH25. Este plásmido contiene el gene *gus*, que codifica para la enzima B-glucuronidase y el gene *bar*, que confiere resistencia al herbicida Basta. Ambos genes estarán bajo el control del promotor ubiquitin de maíz (Christensen *et al.*, 1992). Para la fusión de promotores, se removerá el promotor de ubiquitin por digestión con enzimas de restricción, introduciendo el promotor de interés en el sitio de ligamiento. El sentido correcto de ligación del promotor se verificará mediante patrones de digestión, o secuenciación parcial.





## Actividad 2.2. Aislar el promotor del gen TaPT1 de trigo.

Los factores de transcripción que modulan, al menos la expresión del gen PEPC, difieren entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, indicando la necesidad de identificar promotores específicos dentro de trigo. Se ha descrito un transportador de fosfato de alta afinidad en trigo (TaPT1, accesión AF110180, NCBI), cuya regulación aun no se ha estudiado.

**Actividad 2.2.1. Amplificación y clonamiento del gen TaPT1.** Basado en la secuencia del gen, se diseñarán partidores para amplificar este gen mediante PCR. Las condiciones de amplificación se modificarán hasta obtener un solo producto. Este producto se aislará y clonará en el vector pGEM-T (Promega), confirmándose su identidad mediante secuenciación parcial.

**Actividad 2.2.2. Determinar la expresión del gen TaPT1.** Se evaluará mediante análisis de "Northern blot", la expresión diferencial de TaPT1, para confirmar su expresión específica en raíces, y la respuesta a la disponibilidad de P. El RNA total se extraerá desde los diferentes tejidos de trigo mantenidos en presencia y ausencia de P, usando el producto TRIzol (Gibco-BRL) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los análisis de "Northern" se realizarán según Silva *et al.* (1999).

**Actividad 2.2.3. Aislar la región 5' del gen TaPT1.** Se aislará la región 5' utilizando el método de "DNA walking", se acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Clontech). Este método permite identificar secuencias de DNA genómico desconocidas, que estén adyacentes a secuencias conocidas como cDNA (Siebert *et al.*, 1995). Una vez identificada dicha región, se obtendrá su secuencia nucleotídica y se comparará con promotores conocidos para establecer las secuencias comunes, probablemente responsables de dirigir la expresión génica. Esto permitirá establecer la región promotora del gen TaPT1.

**Actividad 2.2.4. Amplificar y clonar la región promotora del gen TaPT1.** Una vez determinada la región promotora y en base a su secuencia, se diseñaran partidores para amplificarlo y posteriormente clonarlo en el vector pGEM-T.

## Actividad 2.3. Construir fusión entre los promotores y el gen *gus*.

Se construirá una fusión entre el promotor TaPT1 de trigo, y el gen reportero *gus*. La construcción se realizará en el plásmido pACH25, en forma similar a lo descrito en la actividad 2.1.3.

## OBJETIVO ESPECIFICO N° 3. Optimizar la transformación genética de variedades elite de trigo chilenas mediante biobalística

### Actividad 3.1. Optimizar condiciones en cultivares elite de trigo primaveral chileno.

Las construcciones se realizarán en el plásmido pACH25. Este plásmido contiene el gen *gus* que codifica para la enzima B-glucuronidase, y el gen *bar* que confiere resistencia al herbicida



Basta. Ambos genes estarán bajo el control del promotor ubiquitin de maíz (Christensen *et al.*, 1992).

La transformación genética a través biobalística se realizará de acuerdo a Pelligrineschi *et al.*, (2000), usando el dispositivo "PDS 1000/He microprojectible gun" (Bio-Rad). Para establecer el protocolo de transformación bajo las condiciones chilenas, se utilizará la variedad modelo de trigo Bob white (CIMMYT, 2000). Con este propósito, se estudiará presiones de bombardeo, distancias entre disco de ruptura, "macrocarrier" y distancias entre el "macrocarrier" y el tejido. Una vez establecida la metodología en esta variedad, se optimizará en un cv. elite de trigo primaveral chileno obtenido en la actividad 5.1.

### Actividad 3.2. Evaluar expresión transciente del gen *gus*

La expresión transciente se realizará sólo para establecer la óptima condición de bombardeo de células embrionarias. Esto se evaluará mediante análisis histoquímico de células embrionarias, en base a la tinción X-Gluc (Jefferson *et al.*, 1987). Los embriones serán cultivados en un medio de inducción de callos (punto 4.2). La mejor condición de bombardeo será usada para transformar la variedad elite de trigo primaveral seleccionada en el punto anterior, utilizando como testigo la variedad Bob white.

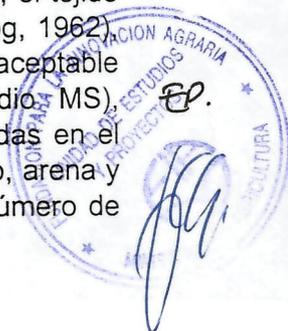
## OBJETIVO ESPECIFICO N° 4. Evaluar la funcionalidad de los promotores aislados desde *Arabidopsis* y trigo

### Actividad 4.1. Transformar trigo con el gen *gus* y *bar*, dirigidos por los promotores de *Arabidopsis* y trigo.

Se utilizará un sistema de co-transformación. Una construcción quimérica se realizará en el plásmido pGEM3Zf, el cual contiene el gen de selección *bar* que confiere resistencia al herbicida BASTA, bajo el control del promotor ubiquitin de maíz (Christensen *et al.*, 1992). Esta construcción ofrecerá la posibilidad de selección de las plantas transgénicas, y se usará con sólo este objetivo. La otra construcción estará formada por el plásmido pACH25 descrito previamente (punto 3.1), con la diferencia que a este plásmido se le eliminará el gen *bar* y el promotor *ubi-1*. El sitio *gus-ubi* será reemplazado por la fusión del gen reportero *gus*, a los promotores de los genes AtPT1, AP y TaPT1.

### Actividad 4.2. Obtener líneas transgénicas T<sub>0</sub>.

Los procedimientos de regeneración de plantas en cultivo *in vitro* se basarán esencialmente en Pelligrineschi *et al.* (2000). Después del bombardeo de las células embrionarias, el tejido será cultivado en un medio de inducción de callos (medio MS) (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa y 2,4-D. Una vez que los embriones logren un aceptable desarrollo, los callos serán transferidos a un medio de regeneración (medio MS) suplementado con el correspondiente agente de selección. Las plantas regeneradas en el medio anterior serán transplantadas a maceteros conteniendo una mezcla de suelo, arena y vermiculita, en una proporción de 1:1:1. De esta forma, se logrará el suficiente número de



eventos de transformación para obtener un valor representativo de expresión del gen *gus*, bajo el control de los nuevos promotores aislados.

#### **Actividad 4.3. Analizar genética y molecularmente transformantes T<sub>0</sub>.**

Para la discriminación fenotípica de plantas transformadas, las plantas T<sub>0</sub> serán tratadas con el herbicida BASTA, con el propósito de seleccionar aquellas que porten el transgen. Es importante mencionar que el análisis fenotípico se basa en la tolerancia al herbicida, debido a que el gen de selección *bar*, y gen de interés, se integrarán en un sistema de co-transformación. De este modo, toda planta resistente al herbicida tendrá incorporado el gen de interés. A través del análisis fenotípico de plantas resistentes y sensibles, será posible determinar la constitución genética de las líneas transgénicas y el número de loci con integración del transgen. Este análisis será determinado a través del test  $\chi^2$ . Adicionalmente, las plantas serán analizadas por PCR, mediante la amplificación del gen *bar* con partidores específicos. Estas evaluaciones permitirán correlacionar el análisis molecular y genético, de modo de determinar la eventual ocurrencia de silenciamiento.

#### **Actividad 4.4. Evaluar nivel de expresión de los nuevos promotores en líneas T<sub>0</sub>**

Plantas transgénicas conteniendo las fusiones del gen de interés al gen reportero *gus*, se crecerán en presencia y ausencia de fósforo. La actividad del promotor se medirá en función del patrón de expresión a nivel histoquímico, de acuerdo a la metodología de Jefferson (1987). Esta actividad permitirá identificar el mejor promotor raíz-específico y modulado por P, para ser utilizado en la transformación de trigo con el gen de la PEPC

### **OBJETIVO ESPECIFICO N° 5. Transformar trigo con el gen de la PEPC de *L. albus***

#### **Actividad 5.1. Caracterizar metabolitos y actividad PEPC en trigo no transformado.**

Con el propósito de identificar fisiológicamente el cultivar de trigo sobre el cual se hará transgénesis, se cuantificará la actividad PEPC de raíces, la concentración de fosfoenolpiruvato (PEP), citrato y malato en el tejido radical, y la exudación de citrato y malato en 4 cvs. de trigo de hábito primaveral, seleccionados entre aquellos con diverso "pedigree". Como cultivos de referencia se utilizarán lupino blanco y trigo Bob white.

La cuantificación de exudados de citrato y malato se realizará en plantas mantenidas en solución nutritiva, con 2 concentraciones de P (0 y 0,2 mM). Los exudados radicales se coleccionarán durante 2 h, en plantas cosechadas a los 7, 14 y 21 días después del transplante, de acuerdo a la metodología descrita para lupino (Peñaloza *et al.*, 2000). Los exudados se esterilizarán por filtración, se concentrarán por evaporación, se resuspenderán en 0,008 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se analizarán por HPLC (Peñaloza *et al.*, 2001).

La cuantificación de PEP, citrato y malato intracelular se realizará en plantas muestreadas en los tiempos indicados anteriormente. Los metabolitos se extraerán en ácido perclórico, a partir de tejido congelado en nitrógeno líquido. El extracto se centrifugará, utilizándose el





sobrenadante para determinar la concentración de PEP de acuerdo a Stitt *et al.* (1989), y el citrato y malato mediante HPLC. Las evaluaciones anteriores se complementarán con mediciones de actividad PEPC de raíces. Estas cuantificaciones se realizarán a los tiempos y en los tratamientos de P señalados anteriormente, de acuerdo a metodologías previamente descritas (Peñaloza *et al.*, 2000).

### **Actividad 5.2. Construir fusión entre promotor regulado por fósforo y la PEPC**

Se dispondrá de tres construcciones génicas. La primera consistirá en el mejor promotor específico de raíces y regulado por fósforo identificado en la actividad 4.4, fusionado con el cDNA de la PEPC. La segunda construcción será similar a la anterior, excepto que se utilizará el promotor del gen de la ubiquitina. Ambas construcciones se insertarán en el plásmido pGEM3Zf descrito en la actividad 4.2. La tercera construcción consistirá en el gen de selección *bar*, usando el plásmido pACH25 descrito previamente.

### **Actividad 5.3. Transformar trigo elite con el gen PEPC.**

Los genes de interés serán siempre introducidos a trigo en un sistema de co-transformación con el gen de selección *bar*. Esto involucra transformar simultáneamente con la construcción del gen *bar*, más una de las dos construcciones conteniendo la PEPC. El gen *bar* sólo se usará como marcador de selección en cultivo *in vitro*, para la identificación de las plantas no transformadas. Con el objetivo de prescindir de plantas resistentes al herbicida BASTA y disponer de una planta transgénica más "limpia", se intentará eliminar dicho gen del genoma de trigo, en la eventualidad de lograrse integración genómica en diferentes loci.

### **Actividad 5.4. Obtener líneas transgénicas T<sub>0</sub>.**

Los medios de cultivos y procedimientos *in vitro*, se realizarán de acuerdo a lo descrito en la actividad 4.2.

### **Actividad 5.5. Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T<sub>0</sub>.**

Se realizará de manera similar a lo indicado en la actividad 4.3.

### **Actividad 5.6. Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T<sub>1</sub>.**

Las líneas transgénicas T<sub>1</sub> se obtendrán de la autopolinización de las líneas transgénicas T<sub>0</sub>, positivas a la presencia del gen PEPC a nivel genético y molecular. Este análisis se realizará de manera similar a lo descrito en la actividad 4.3. La segunda generación de plantas transgénicas (T<sub>1</sub>) se seleccionará nuevamente en función a la tolerancia al herbicida BASTA, debido a que no se conoce su condición genética (hemizigosis, heterocigosis y homocigosis) de la primera generación. Una vez lograda la homocigosis, no será necesario la selección fenotípica posterior. La homocigosis se logrará seleccionando las plantas a autopolinizar considerando sus patrones de segregación. Las plantas homocigotas debieran presentar la herencia mendeliana típica de sólo un gen. En caso contrario, podría asumirse la presencia





de más de un sitio de integración genómica. A este nivel de generación transgénica, el número de copias y loci integradas en el genoma de trigo transformado será determinado por "Southern blot" (Sambrook *et al.*, 1989). Con este propósito, el ADN genómico total de las líneas transgénicas será digerido con enzimas de restricción. Los fragmentos de ADN serán separados en geles de agarosa, transferidos a membranas de hibridación, e hibridizadas con la sonda PEPC, marcada con  $^{32}\text{P}$ .

### Actividad 5.7. Caracterizar fisiológicamente líneas transgénicas T<sub>1</sub>.

Con el objetivo de asociar la exudación de ácidos orgánicos en plantas transformadas, con alteraciones en la disponibilidad de metabolitos y/o en la actividad de enzimas que participan en el flujo de carbono en la raíz, se evaluará concentración de fosfoenolpiruvato (PEP), citrato y malato, y la actividad específica de las enzimas PEPC, citrato sintasa y aconitasa, en plantas transformadas con la construcción quimérica completa, y sólo con el promotor (control). Estas evaluaciones se complementarán con mediciones de fotosíntesis neta, con el propósito de determinar el flujo de carbono atmosférico fijado en hojas.

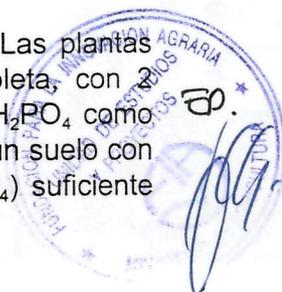
**Cuantificar la actividad enzimática *in vitro*.** Se cuantificará la actividad de las enzimas citrato sintasa, PEPC y aconitasa. La actividad citrato sintasa se evaluará espectrofotométricamente monitoreando la reducción de Acetil CoA en presencia de DTNB a 214 nm (Landschutze *et al.*, 1995). PEPC se cuantificará en una reacción acoplada a la malato dehidrogenasa, monitoreando la reducción del NAD a 340 nm (Peñaloza *et al.*, 2000). La actividad aconitasa total (citosólica y mitocondrial) se determinará de acuerdo a Takita *et al.* (1999). Los resultados se expresarán como actividad específica, cuantificándose las proteínas mediante Bradford (1976).

**Cinética de exudación de citrato y malato.** Se colectarán y cuantificarán exudados de citrato y malato en plantas transformadas mantenidas en solución nutritiva en ausencia de P, y en presencia de 0,2 mM P. La cuantificación de ácidos se realizará mediante HPLC, a partir de extractos colectados a los 7, 14 y 21 días después del transplante. Como control se utilizarán plantas no transformadas, y transformadas sólo con el gen de selección.

**Cuantificación de metabolitos.** Se evaluará PEP, citrato y malato intracelular de acuerdo a las metodologías descritas en el punto 2.1. Estas evaluaciones se realizarán en 4 plantas transgénicas previamente evaluadas por exudación de citrato y malato, mantenidas en solución nutritiva en ausencia de P, y en presencia de 0,2 mM P.

**Efecto de la expresión de la PEPC sobre la fotosíntesis.** Se realizarán curvas diurnas de asimilación de  $\text{CO}_2$  y se determinará la fotosíntesis neta a diferentes intensidades de luz y temperatura. Estas mediciones se realizarán en un medidor portátil de fotosíntesis Ciras-1 (PP-Systems) dotado de una cubeta para medición con fuente de luz propia ( $0-100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y control de temperatura. Este instrumento permite determinar simultáneamente fotosíntesis neta, transpiración, conductancia estomática y temperatura de la hoja.

**Capacidad para utilizar fosfatos desde fuentes de P de baja solubilidad.** Las plantas transgénicas se evaluarán en vermiculita regada con solución nutritiva completa, con tratamientos de fuentes de P de baja solubilidad (Ca-P y Al-P). Se utilizará  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como nutriente control. Adicionalmente, se evaluarán 4 tratamientos de dosis de P en un suelo con P inicial de aproximadamente 4 mg/kg. Este suelo se fertilizará con P ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) suficiente



para obtener concentraciones fluctuantes entre 4 mg/kg y 32 mg/kg suelo (i.e. 4, 8, 16 y 32 mg P/kg suelo). Las plantas se cosecharán a los 60 días, cuantificándose biomasa aérea y radical, concentración foliar y radical de P y Mn, y el pH final e inicial del suelo.

**Capacidad para tolerar concentraciones de aluminio fitotóxicas.** Plantas transformadas con habilidad para crecer en presencia de fuentes de P de baja solubilidad, como Al-P, serían tolerantes a aluminio fitotóxico ( $Al^{3+}$ ). Esta capacidad se evaluará en suelos con alto % de saturación de aluminio (aproximadamente 40%), incubados con  $CaCO_3$  suficiente para obtener 4 tratamientos de saturación de aluminio fluctuantes entre 40 y 0,2% (Peñaloza *et al.*, 1999). Las plantas se cosecharán a los 60 días, cuantificándose biomasa aérea y radical, y concentración de  $Al^{3+}$  y Mn foliar y radical.

#### **Actividad 5.8. Mapear físicamente el transgen en líneas elite T1.**

El mapeo físico se realizará en plantas seleccionadas de acuerdo a los resultados de la actividad 5.7. El objetivo del mapeo físico es determinar en forma inequívoca, la integración física del gen PEPC, número de loci y cromosoma(s) que portan el transgen. Este análisis permitirá confirmar el estado genético de líneas transgénicas. Para el mapeo físico del transgen se usará la técnica conocida como FISH (fluorescent *in situ* hybridization), de acuerdo a la metodología desarrollada por Salvo-Garrido *et al.* (2001). Básicamente, la hibridación *in situ* se realizará en células mitóticas de activo crecimiento, al estado de metafase I.

#### **OBJETIVO ESPECIFICO N° 6. Transformar trigo con otros genes de *L. albus***

Con el propósito de disponer de genes asociados con la exudación de ácidos orgánicos, potencialmente utilizables en trigo ya sea en forma independiente o complementados con el gen de la PEPC, se realizará transgénesis con 3 genes identificados en la actividad 1.10. Estos genes se seleccionarán de acuerdo a su identidad y probable función metabólica en plantas deficientes en P. INIA Carillanca dispone de un cDNA con probable homología al gen *Sqdx*, cuyo producto corresponde a una enzima que participa en el reciclaje de Pi intracelular en plantas deficientes en P, movilizándolo desde fosfolípidos de membrana. Este gen es un potencial candidato para ser evaluado mediante transgénesis en trigo.

#### **Actividad 6.1. Construir fusiones entre promotores regulados y constitutivos, y otros genes de *L. albus*.**

Los 3 genes de interés se fusionarán en las mismas construcciones descritas en la actividad 5.2.

#### **Actividad 6.2. Transformar trigo con otros genes de *L. albus*.**

Se procederá esencialmente a lo descrito en la actividad 5.3.





### **Actividad 6.3. Obtener líneas transgénicas T<sub>0</sub>.**

Se procederá esencialmente a lo descrito en la actividad 5.4.

### **Actividad 6.4. Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T<sub>0</sub>.**

Se procederá esencialmente a lo descrito en la actividad 5.5.

### **Actividad 6.5. Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T<sub>1</sub>.**

Se procederá esencialmente a lo descrito en la actividad 5.6.

### **Actividad 6.6. Caracterización fisiológica de líneas transgénicas T<sub>1</sub>.**

Debido a que se desconoce la identidad de los genes que se utilizarán en estas actividades, no es posible desarrollar anticipadamente la metodología para la caracterización fisiológica de las líneas transformadas. Por lo tanto, solo se ha considerado evaluar la capacidad de las plantas transformadas para crecer en suelos bajos en P disponible, de acuerdo a la metodología descrita en la actividad 5.7. Puesto que el suelo es el ambiente final de trigo transformado, esta evaluación permitirá cuantificar la contribución del transgen a la tolerancia al estrés por deficiencia de P, al compararlo con plantas no transformadas. El desarrollo de este objetivo es esencial para determinar la utilidad potencial de los tres genes que se identificarán en la actividad 1.10.

## **Referencias**

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 717: 1448-1454.

CIMMYT, 2000. CIMMYT in 1999-2000. Science and sustenance. Mexico D.F.: CIMMYT. ISSN:0188-9214.

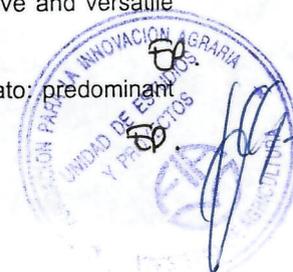
Christensen, A.H., Sharrock, R.A. y Quail, P.H. 1992. Maiz polyubiquitin genes: Genes, structure, termal perturbation of expresion and transcript splicing, and promoters activity following transfer to protoplast by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689.

Daram,P., Brunner,S., Rausch,C., Steiner,C., Amrhein,N. y Bucher,M. 1999. Pht2;1 encodes a low-affinity phosphate transporter from Arabidopsis. *Plant Cell* 11: 2153-2166.

Haran, S., Logendra, S., Seskar, M., Bratanova, M. y Raskin, I. 2000. Characterization of Arabidopsis acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression. *Plant Physiol.* 124:615-626.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. y Bevan, M.W. 1987. Gus fusions:β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene-fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901-3907.

Landschtze, V., Muller.-Rober, B. y Willmitzer, L. 1995. Mitochondrial citrate synthase from potato: predominant expression in mature leaves and young flower buds. *Planta* 196:756-764.



Liang, P. y Pardee, A.B. 1992. Differential display of eucariotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971

Liang, P., Averboux, L. y Pardee, A.B. 1993. Distribution and cloning of eucariotic mRNA by means of differential display; refinements and optimization. *Nucl. Acids Res.* 21:3269-3275.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-479.

Okumura, S., Mitsukawa, N., Shirano, Y. y Shibata, D. 1998. Phosphate transporter gene family of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 5: 261-269.

Peñaloza, E., Corcuera, L.J., Martínez, J. y Montenegro, A. 1999. Differential aluminum tolerance of lupin species grown in soil and in nutrient solution. In: van Santen, E., Wink, M., Weissmann, S. y Romer, P. (Eds.), *Lupin, An Ancient Crop for the New Millennium. Proceeding of the 9<sup>th</sup> International Lupin Conference*, W. Germany, pp. 252-253.

Peñaloza, E., Carvajal, N., Corcuera, L. y Martínez, J. 2000. Exudación de citrato y actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en raíces de lupino blanco, en respuesta a variaciones en la disponibilidad de fósforo. *Agricultura Técnica* 60:89-98.

Peñaloza, E., Corcuera, J.L. y Martínez, J. 2001. Spatial and temporal variation in citrate and malate efflux and tissue concentration as affected by P-stress in roots of white lupin. *Plant Soil* (aceptado)

Pelligrinineschi, A.P., Fennell, S., Mclean, S., Brito, R.M., Velazquez, L., Salgado, M., Olivares, J.J., Hernandez, R. y Hoisington, D. 2000. Rutine transformation system for use with CIMMYT wheat varieties. In: Kohli, M. Francis, M. (Eds.), *Application of Biotechnologies to Wheat Breeding. Proceedings of a Conference at La Estanzuela, Uruguay, November 19-20, 1998*. Montevideo Uruguay. P. 111-120.

Salvo-Garrido, H., Travella, S., Schwarzacher, T., Harwood, W.A. y Snape, J.W. 2001. An efficient method for the physical mapping of transgenes in barley using *in situ* hybridization. *Genome*, 44(1):104-110.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. Edition. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Seitz, B., Klos, C., Wurm, M. y Tenhaken, R. 2000. Matrix polysaccharide precursors in *Arabidopsis* cell walls are synthesized by alternate pathways with organ-specific expression patterns. *Plant J.* 21: 537-546.

Shah, J. y Klessig, D.F. 1996. Identification of a salicylic acid-responsive element in the promoter of the tobacco pathogenesis-related  $\beta$ -1,3-glucanase gene, *PR-2d*. *Plant J.* 10: 1089-1101.

Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A. y Lukyanov, S. A. 1995. An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23:1087-1088.

Silva, H., Yoshioka, K., Dooner, H. y Klessig, D.F. 1999. Characterization of a new *Arabidopsis* mutant exhibiting enhanced disease resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 1053-1063.

Stitt, M., Lilley, R.M., Gerhardt, R. y Heldt, H.W. 1989. Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymol.* 174: 518-552

The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.





## 10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2001

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
3	3.1	Optimizar condiciones de transformación en cultivares elite de trigo primaveral chileno	Diciembre	-





## 10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual)

AÑO 2002

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
1	1.1.	Diseñar y construir partidores para experimentos "Differential display"	Enero	Enero
1	1.2.	Crecimiento de plantas y extracción RNA	Marzo	Octubre
1	1.8	Construir genoteca cDNA	Marzo	Agosto
1	1.9.	Aislar cDNA de PEPC	Agosto	Diciembre
2	2.1.1.	Amplificar promotor de los genes AtPT1 y AP de <i>A. thaliana</i>	Marzo	Mayo
2	2.1.2	Clonar y secuenciar los promotores	Junio	Agosto
2	2.1.3.	Construir fusión entre los promotores aislados y gen <i>gus</i>	Septiembre	Noviembre
2	2.2.1	Amplificar y clonar el gen TaPT1 de trigo	Julio	Octubre
2	2.2.2	Determinar la expresión del gen TaPT1	Octubre	Noviembre
2	2.2.3.	Aislar la región 5' del gen TaPT1	Noviembre	Diciembre
3	3.1	Optimizar condiciones de transformación en cultivares elite de trigo primaveral chileno	Enero	Abril
3	3.2.	Evaluar expresión transciente del gen <i>gus</i>	Febrero	Mayo
4	4.1.	Transformar trigo con los genes <i>gus</i> y <i>bar</i> , y nuevos promotores	Noviembre	Diciembre
5	5.1.	Caracterizar metabolitos y actividad PEPC en trigo no transformado	Febrero	Noviembre





## 10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2003

Objetivo especific. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
1	1.2.	Crecimiento de plantas y extracción RNA	Marzo	Mayo
1	1.3.	Experimentos "Differential display"	Enero	Junio
1	1.4	Reamplificar productos diferenciales	Junio	Julio
1	1.5.	Clonar productos diferenciales	Julio	Diciembre
1	1.6.	Secuenciar y analizar homologías	Diciembre	Diciembre
2	2.2.3.	Aislar la región 5' del gen TaPT1	Enero	Mayo
2	2.2.4	Amplificar y clonar la región promotora del gen TaPT1	Abril	Septiembre
2	2.2.5.	Construir fusión del promotor identificado con gen <i>gus</i>	Septiembre	Octubre
4	4.1.	Transformar trigo con los genes <i>gus</i> y <i>bar</i> , y nuevos promotores	Enero	Diciembre
4	4.2.	Obtener líneas transgénicas T <sub>0</sub>	Febrero	Agosto
4	4.3.	Analizar genética y molecularmente transformantes T <sub>0</sub>	Febrero	Agosto
4	4.4.	Evaluar nivel de expresión de los nuevos promotores en líneas T <sub>0</sub>	Febrero	Agosto





## 10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2004

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
4	4.1.	Transformar trigo con los genes <i>gus</i> y <i>bar</i> , y nuevos promotores	Enero	Abril
4	4.2.	Obtener líneas transgénicas T <sub>0</sub>	Enero	Julio
4	4.3.	Analizar genética y molecularmente transformantes T <sub>0</sub>	Enero	Julio
4	4.4.	Evaluar nivel de expresión de los nuevos promotores en líneas T <sub>0</sub>	Enero	Julio
5	5.2	Construir fusión entre promotor identificado y PEPC	Junio	Agosto
5	5.3	Transformar trigo elite con gen PEPC	Agosto	Diciembre
5	5.4	Obtener líneas transgénicas T <sub>0</sub>	Octubre	Diciembre
5	5.5	Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T <sub>0</sub>	Octubre	Diciembre
6	6.1	Construir fusiones entre promotor identificado y otros genes de lupino	Julio	Septiembre
6	6.2.	Transformar trigo con otros genes de lupino	Septiembre	Diciembre
6	6.3	Obtener líneas transgénicas T <sub>0</sub>	Diciembre	Diciembre
6	6.4	Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T <sub>0</sub>	Diciembre	Diciembre





## 10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2005

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
5	5.4	Obtener líneas transgénicas T <sub>0</sub>	Enero	Marzo
5	5.5	Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T <sub>0</sub>	Enero	Marzo
5	5.6.	Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T <sub>1</sub>	Abril	Octubre
5	5.7	Caracterizar fisiológicamente líneas transgénicas T <sub>1</sub>	Junio	Noviembre
5	5.8	Mapear físicamente el transgen en líneas elite T <sub>1</sub>	Agosto	Noviembre
6	6.3	Obtener líneas transgénicas T <sub>0</sub>	Enero	Abril
6	6.4	Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T <sub>0</sub>	Enero	Abril
5	5.6.	Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T <sub>1</sub>	Abril	Octubre
5	5.7	Evaluar capacidad de plantas T <sub>1</sub> para crecer en suelo con bajo P disponible	Abril	Octubre





## 11. RESULTADOS ESPERADOS E INDICADORES

### 11.1 Resultados esperados por objetivo

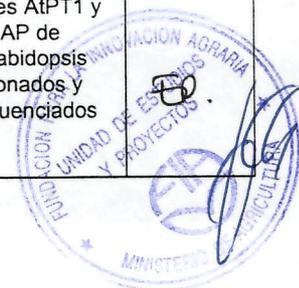
Obj. Esp. N°	Resultado	Indicador	Meta Final	Parcial	
				Meta	Plazo
1	Obtención de cDNAs de <i>L. albus</i> , desde tejidos que exudan citrato en respuesta a la deficiencia de fósforo	Clones de cDNAs secuenciados	Disponer de al menos 10 genes clonados, más cDNA de PEPC	cDNA de al menos el gen de PEPC de <i>L. albus</i>	Octubre 2004
2	Obtención de promotores con alta probabilidad de ser específicos de raíz y regulados por P, funcionales en trigo	Clones con la región 5' de los genes AtPT1 y AP de Arabidopsis, y del gen TaPT1 de trigo	Clonamiento de los 3 promotores	Clonamiento de al menos el promotor del gen TaPT1 de trigo	Octubre 2003
3	Optimización de condiciones de transformación por biobalística de la variedad de trigo Bob white, y de trigos elite chilenos	% de eficiencia de transformación	Plantas de trigo transformadas con gen reportero; Porcentaje de eficiencia de transformación de 2% en trigo chileno y 4% en Bob white	Capacidad de transformar, al menos, la variedad de trigo Bob white	Mayo 2002
4	Determinar la funcionalidad en trigo, de promotores específico de raíces y regulados por fósforo	Expresión del gen <i>gus</i> sólo en raíces, y regulado por fósforo	Promotor específico de raíces y regulado por fósforo, aislado desde trigo o Arabidopsis	Disponer de al menos un promotor	Julio 2004
5	Trigo transformado con cDNA de la PEPC de <i>L. albus</i> con mayor capacidad de exudar ácidos orgánicos y movilizar P desde fuentes de P de baja solubilidad	Trigo con el gen de la PEPC incorporado en su genoma, con habilidad para exudar citrato y/o malato, y utilizar el fósforo desde fuentes insolubles, en cantidades significativamente superiores al control	20% de incremento en la concentración y exudación de citrato y/o malato. 10% de incremento en la concentración de P inorgánico en la fitomasa de la planta, como consecuencia de la movilización de P desde fuentes de P de baja solubilidad	10% de incremento en la concentración y exudación de citrato y/o malato. 10% de incremento en la concentración de P inorgánico en la fitomasa de la planta, como consecuencia de la movilización de P desde fuentes de P de baja solubilidad	Noviembre 2005
6	Trigo transformado con tres genes de <i>L. albus</i> aislados desde tejidos que exudan citrato en respuesta a la deficiencia de fósforo	Capacidad de las plantas transformadas para crecer en suelos con baja disponibilidad de fósforo	Aun cuando se desconoce la identidad de los genes, se espera que cada uno de ellos contribuya a incrementar 10% la fitomasa aérea y la concentración de P inorgánico	Al menos uno de los tres genes contribuye a aumentar 10% la fitomasa aérea y la concentración de P inorgánico en suelos con bajo P disponible	Octubre 2005





## 11.2 Resultados esperados por actividad

Obj. Esp. N°	Activid. N°	Resultado	Indicador	Meta Final	Parcial	
					Meta	Plazo
1	1.1	Disponer de partidores diseñados para identificar expresión diferencial de genes mediante "differential display"	Número de oligonucleótidos	Veintiocho oligonucleótidos	Veintiocho oligonucleótidos	Enero 2002
1	1.2	Obtener RNA desde <i>L. albus</i> , para realizar experimentos de "differential display"	Cantidad de RNA total	200 µg RNA total, extraído sólo de tejidos que exuden citrato (raicillas proteoideas)	200 µg RNA total	Mayo 2003
1	1.3	Aislar fragmentos de cDNA expresados diferencialmente en <i>L. albus</i> en respuesta a la deficiencia de fósforo	N° de productos diferenciales (cDNAs)	Aproximadamente 100 productos diferenciales	80 productos diferenciales	Junio 2003
1	1.4	Reamplificar productos diferenciales aislados en el punto 1.3	N° de productos diferenciales reamplificados	Aproximadamente 80 productos diferenciales	50 productos diferenciales	Julio 2003
1	1.5	Clonar productos diferenciales, aislados en el punto 1.4	N° de productos diferenciales (cDNA) clonados	50 productos clonados	30 productos clonados	Diciembre 2003
1	1.6	Secuenciar y determinar probable identidad y función de los cDNAs clonados en el punto 1.5, mediante análisis de homología con genes conocidos	N° de clones y N° de colonias por clon secuenciados e identificados	50 clones, cada uno secuenciado al menos 3 veces, desde colonias independientes (i.e. 135 secuenciaciones)	30 clones, cada uno secuenciado al menos 3 veces desde colonias independientes (i.e. 90 secuenciaciones)	Febrero 2004
1	1.7	Confirmar expresión diferencial de fragmentos mediante "northern blot"	N° de fragmentos positivos	40 fragmentos de los 50 secuenciados en el punto 1.6.	30 fragmentos de los secuenciados en el punto 1.6.	Agosto 2004
1	1.8	Disponer de una banco de cDNAs de raicillas proteoideas de <i>L. albus</i> mantenido en ausencia de fósforo	Genoteca de cDNA en fago lambda, con alto título	Una genoteca de cDNA en fago lambda, con alto título	Una genoteca de cDNA en fago lambda, con alto título	Agosto 2002
1	1.9	Obtener cDNA correspondiente al gen de PEPC de <i>L. albus</i>	Secuencia del cDNA con homología a PEPC de otras fuentes	cDNA correspondiente al gen de PEPC de <i>L. albus</i>	cDNA correspondiente al gen de PEPC de <i>L. albus</i>	Diciembre 2002
1	1.10	Obtener cDNAs codificantes de otros genes de <i>L. albus</i> que se expresan en ausencia de fósforo (identificados en el punto 1.7)	N° de clones	Clonar 30 cDNAs de otros genes de <i>L. albus</i> que se expresan en ausencia de fósforo	Clonar 20 cDNAs de otros genes de <i>L. albus</i> que se expresan en ausencia de fósforo	Octubre 2004
2	2.1.1	Aislar un fragmento de DNA correspondiente al promotor de los genes AtPT1 y AP de Arabidopsis	Aislamiento de promotores	Promotor de los genes AtPT1 y AP de Arabidopsis	Promotor de los genes AtPT1 y AP de Arabidopsis	Mayo 2002
2	2.1.2.	Clonar y secuenciar promotores aislados en el punto 2.1.1.	Clonamiento y secuenciación de promotores	Promotor de los genes AtPT1 y AP de Arabidopsis clonados y secuenciados	Promotor de los genes AtPT1 y AP de Arabidopsis clonados y secuenciados	





2	2.1.3 .	Disponer de una construcción génica con los promotores de Arabidopsis (AtPT1 y AP), y con el promotor de trigo (TaPT1) fusionados al gen <i>gus</i>	Construcciones promotor-gen reportero	Disponer de una construcción génica con los promotores de Arabidopsis (AtPT1 y AP), y con el promotor de trigo (TaPT1) fusionados al gen <i>gus</i>	Disponer de una construcción génica con los promotores de Arabidopsis (AtPT1 y AP), y con el promotor de trigo (TaPT1) fusionados al gen <i>gus</i>	Noviembre 2002
2	2.2.1	Aislar el gen TaPT1 de trigo	Aislar el gen TaPT1 de trigo	Aislar el gen TaPT1 de trigo	Aislar el gen TaPT1 de trigo	Octubre 2002
2	2.2.2.	Comprobar que el gen TaPT1 se expresa sólo en raíces, en trigos mantenidos en ausencia de fósforo	Resultados experimentos "Northern blot"	Verificar que el gen TaPT1 se exprese sólo en raíces y bajo deficiencia de fósforo en trigo	Verificar que el gen TaPT1 se exprese sólo en raíces y bajo deficiencia de fósforo en trigo	Noviembre 2002
2	2.2.3.	Aislar la región de DNA donde se encuentra el promotor del gen TaPT1	Clon con la región 5' del gen TaPT1	Región de DNA donde se encuentra el promotor del gen TaPT1	Región de DNA donde se encuentra el promotor del gen TaPT1	Mayo 2003
2	2.2.4.	Aislar el promotor del gen TaPT1 de trigo	Aislamiento del promotor TaPT1	Promotor del gen TaPT1 de trigo	Promotor del gen TaPT1 de trigo	Septiembre 2003
2	2.3.	Disponer de una construcción génica con el promotor de TaPT1 fusionado al reportero gen <i>gus</i>	Construcción promotor-gen reportero	Disponer de una construcción génica con el promotor de TaPT1 fusionado al gen reportero <i>gus</i>	Disponer de una construcción génica con el promotor de TaPT1 fusionado al gen reportero <i>gus</i>	Octubre 2003
3	3.1.	Disponer de construcciones génicas para realizar experimentos de optimización de transformación mediante biobalística en trigo	Plasmidio con gen reportero <i>gus</i> y gen de selección <i>bar</i> , fusionados al promotor ubiquitin	Construcción para realizar experimentos de optimización de transformación de trigo	Construcción para realizar experimentos de optimización de transformación de trigo	Abril 2002
3	3.2.	Obtener una condición de transformación a través de biobalística que genere una alta eficiencia de transformación en trigo	Expresión transciente del gen <i>gus</i> en células embrionarias de trigo.	Optimizar las condiciones de biobalística que permita transformar eficientemente una variedad de trigo primaveral chileno	Optimizar las condiciones de biobalística que permita transformar eficientemente una variedad de trigo primaveral chileno	Mayo 2002
4	4.1	Co-transformar células embrionarias de trigo con las construcciones promotor ubiquitin-gen <i>bar</i> y promotores de Arabidopsis-gen <i>gus</i> y trigo-gen <i>gus</i>	Crecimiento de células embrionarias de trigo en medio selectivo de transformación	Obtener embriones transformados con las construcciones indicadas	Obtener embriones transformados con las construcciones indicadas	Abril 2004
4	4.2	Obtener primera generación ( $T_0$ ) de plantas transgénicas portadoras de la construcción quimérica de interés, a partir de células embrionarias transformados	Porcentaje de eficiencia de transformación de un cv. de trigo chileno	3% de eficiencia	1% de eficiencia	Julio 2004
4	4.3	Verificar la presencia de los genes introducidos en las plantas transformadas $T_0$	Presencia del promotor en plantas transformadas, detectada por PCR	Plantas resistentes al herbicida BASTA, con la construcción promotor- <i>gus</i> incorporada	Plantas resistentes al herbicida BASTA, con la construcción promotor- <i>gus</i> incorporada	Julio 2004





4	4.4.	Definir los promotores funcionales en raíces y regulados por fósforo	Resultado de los ensayos de actividad del gen <i>gus</i>	Promotores funcionales, específicos de raíz, modulados por fósforo	Al menos uno de los tres promotores evaluados, funcionales	Julio 2004
5	5.1.	Criterios fisiológicos para seleccionar la variedad de trigo chileno a ser utilizada en transgénesis	Contenido y exudación de citrato y malato, concentración de fosfoenolpiruvato y actividad PEPC, en raíces de plantas de trigo no transformado	Determinar la concentración de citrato, malato, fosfoenolpiruvato y actividad PEPC en raíces de trigo no transformado	Determinar la concentración de citrato, malato, fosfoenolpiruvato y actividad PEPC en raíces de trigo no transformado	Noviembre 2002
5	5.2.	Disponer de una construcción génica con el mejor promotor identificado en el objetivo 4, y el cDNA de PEPC	Plasmidio con la fusión promotor-PEPC	Disponer de una construcción génica con el mejor promotor y el cDNA de PEPC	Disponer de una construcción génica con el mejor promotor y el cDNA de PEPC	Agosto 2004
5	5.3	Transformar células embrionarias de trigo con la construcción génica desarrollada en el punto 5.2	Crecimiento de células embrionarias de trigo, en medio selectivo	Obtener células embrionarias de trigo transformadas con la construcción promotor-PEPC	Obtener células embrionarias de trigo transformadas con la construcción promotor-PEPC	Diciembre 2004
5	5.4.	Obtener primera generación de plantas transgénicas (T <sub>0</sub> ) portadoras del gen de interés, a partir de las células embrionarias transformados	Crecimiento de las plantas de trigo en medio selectivo	Obtener plantas desde células embrionarias transformadas	Obtener plantas desde células embrionarias transformadas	Marzo 2005
5	5.5.	Determinar la presencia de los genes introducidos en las plantas transformadas	Presencia de la PEPC en plantas transformadas, detectada por PCR	Plantas resistentes al herbicida BASTA, con la construcción promotor-PEPC incorporada	Plantas resistentes al herbicida BASTA, con la construcción promotor-PEPC incorporada	Marzo 2005
5	5.6	Determinar el número de copias de la PEPC en las plantas T <sub>1</sub> transformadas	Análisis de "Southern blot"	Confirmar que el gen de la PEPC se integró al genoma del trigo	Confirmar que el gen de la PEPC se integró al genoma del trigo	Octubre 2005
5	5.7	Plantas transformadas con la PEPC, caracterizadas fisiológicamente, y con habilidad para crecer en presencia de fuentes de fósforo de baja solubilidad	Concentración de metabolitos, actividad enzimática, crecimiento en fuentes de P de baja solubilidad, y tolerancia a aluminio	Disponer de plantas transformadas con la PEPC, con mayor capacidad para utilizar fuentes de P insoluble y tolerar aluminio fitotóxico	Disponer de plantas transformadas con la PEPC, con mayor capacidad para utilizar fuentes de P insoluble y tolerar aluminio fitotóxico	Noviembre 2005
5	5.8	Identificar cromosoma(s), número de loci y número de sitios de integración del gen de PEPC en plantas de trigo transformadas	Resultados de análisis FISH	Identificar cromosoma(s), número de loci y número de sitios de integración del gen de PEPC en plantas de trigo transformadas	Identificar cromosoma(s), número de loci y número de sitios de integración del gen de PEPC en plantas de trigo transformadas	





6	6.1.	Disponer de una construcción génica con el mejor promotor identificado en el objetivo 4, fusionado a genes aislados de <i>L. albus</i>	Plasmidios con la fusión promotor-genes de <i>L. albus</i>	Disponer de una construcción génica con el mejor promotor y el cDNA de tres genes aislados de <i>L. albus</i>	Disponer de una construcción génica con el mejor promotor y el cDNA de tres genes aislados de <i>L. albus</i>	Septiembre 2004
6	6.2.	Transformar células embrionarias de trigo con la construcción génica desarrollada en el punto 6.1	Crecimiento de células embrionarias de trigo, en medio selectivo	Obtener células embrionarias de trigo transformadas con 3 construcciones promotor-genes de <i>L. albus</i>	Obtener células embrionarias de trigo transformadas con 3 construcciones promotor-genes de <i>L. albus</i>	Enero 2005
6	6.3	Obtener primera generación de plantas transgénicas (T <sub>0</sub> ) portadoras de las construcciones génicas anteriores, partir de las células embrionarias transformadas	Crecimiento de las plantas de trigo en medio selectivo	Obtener plantas desde células embrionarias transformadas	Obtener plantas desde células embrionarias transformadas	Abril 2005
6	6.4	Determinar la presencia de las construcciones génicas introducidas en las plantas transformadas T <sub>0</sub>	Presencia de las construcciones génicas en plantas transformadas, detectada por PCR	Plantas resistentes al herbicida BASTA, con la construcción promotor-gen de lupino incorporado	Plantas resistentes al herbicida BASTA, con la construc. Promotor-gen de lupino incorporado	Abril 2005
6	6.5	Determinar la presencia de las construcciones génicas introducidas en las plantas transformadas T <sub>1</sub>	Presencia de las construcciones génicas en plantas transformadas, detectada por PCR	Confirmar que las construcciones génicas se integraron al genoma del trigo	Confirmar que las construcciones génicas se integraron al genoma del trigo	Octubre 2005
6	6.6	Evaluar el potencial de tres transgenes, para otorgar capacidad al trigo para crecer en suelo con bajo fósforo disponible	Peso fresco de la biomasa aérea y concentración de P inorgánico	Los tres genes contribuyen a incrementar 10% la fitomasa aérea y la concentración de P inorgánico	Al menos uno de los tres genes contribuye a incrementar 10% la fitomasa aérea y la concentración de P inorgánico	Octubre 2005

## METAS DE LA PROPUESTA

- Junio 2002      Disponer de un sistema de transformación de plantas funcionando en trigo
- Junio 2004      Disponer de un promotor raíz específico y modulado por fósforo, funcional en trigo.
- Diciembre 2005      Disponer de líneas de trigo transgenicas, con capacidad para solubilizar fósforo (P) desde fuentes de P de baja solubilidad





## 12. IMPACTO DEL PROYECTO

### 12.1. Económico

El desarrollo y utilización de cultivares de trigo con habilidad para movilizar el fósforo inorgánico retenido en el suelo se traducirá en los siguientes beneficios económicos:

- **Reducción de los costos de producción.** La liberalización de aranceles como consecuencia de los tratados de libre comercio enfrenta a la región a una situación de competitividad probablemente no sostenible. Los rendimientos del trigo en la agricultura tecnificada prácticamente han tocado "techo", de manera que es poco probable lograr incrementos de rendimiento importantes, mediante el mejoramiento genético convencional. Por lo tanto, se hace necesario implementar estrategias dirigidas a reducir costos de producción, de modo de lograr mayor competitividad en la agricultura del centro sur y sur del país. La magnitud de la reducción de costos mediante el uso de variedades transgénicas, será proporcional a su capacidad para solubilizar fosfatos del suelo. Asumiendo un cv. adaptado a la IX Región, la superficie de cultivo en suelos volcánicos (167.000 ha), y un costo promedio de US\$ 40/ha en fertilizantes fosfatados, eventuales incrementos en la movilización de P de 5, 10, 20 y 30%, provocarán reducción de costos equivalentes a US\$ 0,33, 0,67, 1,3 y 2,0 millones anuales.
- **Reducción de la importación de fertilizantes fosfatados.** El impacto sobre este ítem será proporcional a la reducción en la dosis de  $P_2O_5$ , como consecuencia de la habilidad de los nuevos cvs. para movilizar el P retenido. La incorporación de esta nueva tecnología a otras especies, eventualmente se traduciría en un efecto sumatorio sobre la reducción de importaciones.
- **Aumento del rendimiento del trigo en la pequeña agricultura.** El 70% de la explotaciones dedicadas a la producción de trigo entre la IX Región está representada por la pequeña agricultura mapuche, con rendimientos promedios de alrededor de 15 qqm/ha. La utilización de cvs. con capacidad para movilizar P permitirá aumentar los rendimientos del trigo, manteniendo constante los bajos niveles de fertilización fosfatada actualmente utilizadas en este estrato de la agricultura.
- **Eventual expansión de la producción y utilización de rocas fosfóricas nacionales.** Cultivares que exuden ácidos orgánicos en la rizósfera, tendrán la capacidad de movilizar el P de las rocas fosfóricas. Consecuentemente, esta nueva tecnología pudiera eventualmente traducirse en una mayor utilización de esta fuente de fertilizantes nacionales de lenta solubilidad, cuya producción actualmente no supera las 5.000 Ton anuales.
- Es importante considerar que los ácidos orgánicos movilizan el P unido principalmente al aluminio ( $Al^{3+}$ ) en suelos volcánicos, ligándose a este metal. Puesto que la toxicidad por aluminio ocurre esencialmente en los ápices de la planta, la exudación de ácidos orgánicos a través de estos tejidos radicales se traduciría no sólo en plantas tolerantes a la deficiencia de P, sino también a la toxicidad por aluminio.





## 12.2. Social

El 65% de las explotaciones dedicadas a trigo en el país está representada por superficies inferiores a 1,2 ha, y que contribuyen con el 15% de la producción nacional (ODEPA, Censo Agrícola 1997). Estas explotaciones corresponden a la pequeña agricultura del trigo, cultivo que representa la base de su alimentación. Cualquier tecnología dirigida a mejorar la productividad del cultivo, tendrá impacto social de importancia en este sector de la agricultura. Especial mención se debe hacer a la agricultura mapuche, que representa el estrato más importante de los pequeños agricultores de la IX Región. Los programas de reasignación de tierras realizados por el Estado de Chile, necesariamente deben estar acompañados de un fuerte programa de desarrollo tecnológico en este sector. En el mediano plazo, este proyecto ofrecerá una opción tecnológica para aumentar los rendimientos del trigo de la pequeña agricultura, mediante variedades que utilizarán más eficientemente los reducidos niveles de  $P_2O_5$  normalmente aplicados al cultivo.

## 12.3. Otros (legal, gestión, administración, organizacionales, etc.)

La aplicación de leyes de propiedad intelectual se está traduciendo en una seria limitación al avance tecnológico, obligando a pagar derechos por el uso de ciertas tecnologías. Esto puede llegar a constituirse en un freno al desarrollo de países en crecimiento. Para lograr un avance cuali y cuantitativo en orden a superar las brechas tecnológicas con los países desarrollados, es esencial generar plataformas propias de desarrollo. A este respecto, la implementación de la tecnología de transformación de trigos chilenos, y la obtención de genes propios, con potencial para resolver un problema generalizado de los países que desarrollan su agricultura en suelos fijadores de P, colocará a Chile, y a la IX Región en particular, en una posición de privilegio en el mejoramiento genético del trigo.

El desarrollo de esta propuesta permitirá fortalecer la investigación en el cultivo más importante del país, formar un equipo inter-disciplinario e inter-institucional en un tema de relevancia, y utilizar más eficientemente la infraestructura disponible para biotecnologías en INIA Carillanca.

Aun cuando no existen restricciones para la producción experimental de plantas transgénicas, la autorización para su introducción en el ambiente requiere cumplir requisitos que aseguren su inocuidad. Si bien este proyecto desarrollará plantas transgénicas, su utilización será esencialmente experimental, mientras no se disponga de una legislación que regule su liberalización en el país.





## 13. EFECTOS AMBIENTALES

### 13.1. Descripción (tipo de efecto y grado)

**Continuar con la situación actual; efecto ambiental negativo; grado de impacto mediano a alto en el largo plazo.** Aun cuando el fósforo es un elemento de relativa baja movilidad en el perfil del suelo, la utilización “necesariamente indiscriminada” de fertilizantes fosfatados en suelos volcánicos puede desplazar el fósforo en solución hacia estratas inferiores. Este movimiento del fósforo en el perfil finalmente alcanzará las napas freáticas, contaminando aguas de bebida, lagos, ríos, y el mar (Tilman, 1999). Si bien existen evidencias sobre eutroficación de ecosistemas en lagos del sur del país, se desconoce el impacto de la aplicación indiscriminada de fosfatos en el suelo, sobre la calidad del agua de bebida y su efecto en la población.

**Plantas transgénicas; efecto ambiental neutro.** El desarrollo de plantas transgénicas y sus efectos sobre el medio ambiente y la salud humana es un tema que merece especial atención, pero imposible de abordar de manera extensa. Brevemente, los principales cuestionamientos a plantas transgénicas dicen relación con la posibilidad de cruzamiento natural entre el transgen y los relativos silvestres (o malezas), con las propiedades alergénicas de plantas transformadas, y con la introducción de genes adicionales al transgen de interés. Respecto al primer cuestionamiento, el mejoramiento genético convencional está permanente introduciendo un número indeterminado de genes en los cultivares elite para lograr el objetivo deseado, sin discriminar entre aquellos asociados o no asociados al carácter deseado. En un estudio sobre el tema, Ellstrand (2001) demostró que la posibilidad de cruzamientos entre especies cultivadas y malezas genéticamente emparentadas, es un evento común en la naturaleza, indicando que las variedades desarrolladas mediante mejoramiento convencional, son tan seguras, o inseguras, a aquellas obtenidas mediante transgénesis. Las propiedades alergénicas de plantas genéticamente modificadas merece especial atención, puesto que, a partir de un problema puntual (proteína 2S, transferida a soya), los países desarrollados, particularmente Europa, han visto reducido significativamente el apoyo a la investigación en ingeniería genética de plantas. El problema de los países desarrollados, sin embargo, lo están solucionando los países en desarrollo, en los cuales el área cultivada con plantas transgénicas se incrementó 51% entre 1999 y 2000 (James, 2000). Respecto al último punto, actualmente se están desarrollando nuevas tecnologías dirigidas a eliminar genoma adicional al transgen de interés (“clean technology”). Presiones ambientalistas sobre la investigación biotecnológica pudiera eventualmente afectar la disponibilidad de alimentos en el mundo puesto que, de acuerdo a Norman Borlaug (2000), el continuo progreso en la ingeniería genética de cultivos es crítica para alimentar a la futura población mundial.

**Exudación de ácidos orgánicos en la rizósfera, efecto ambiental probablemente neutro; grado de impacto probablemente neutro.** Los ácidos orgánicos son exudados en la rizósfera como aniones y, como tal, no debieran contribuir a incrementar la acidez del suelo. Esta exudación ocurre en un sistema de co-transporte con protones, desconociéndose el impacto de estos protones sobre el pH del suelo. Se espera que la exudación de ácidos orgánicos en plantas de trigo transgénico sea significativamente inferior a aquella que ocurre en lupino blanco, cultivo que se ha mantenido por más de 30 años en la agricultura campesina de la IX Región. De hecho, los suelos donde se ha cultivado esta especie permitirían obtener una buena aproximación sobre el impacto de la exudación de ácidos orgánicos en las poblaciones microbianas, y en la química del suelo.





### **13.2. Acciones propuestas**

No obstante lo anterior, una acción implícita en el proyecto consiste en la evaluación del impacto de la exudación de citrato, sobre los cambios en la disponibilidad de nutrientes en el suelo, así como los efectos sobre la absorción de nutrientes. Con el propósito de acentuar estas modificaciones que eventualmente pudieran ocurrir en el suelo, las evaluaciones se realizarán, adicionalmente, en plantas transformadas donde el transgen se estará expresando constitutivamente.

### **13.3. Sistemas de seguimiento (efecto e indicadores)**

**Eventual incremento en la acidez de suelos en el corto plazo.** Mediciones cuantitativas de pH del suelo inicial y final, en ensayos de macetero (actividad 5.7).

**Eventual incremento en la concentración de ciertos metales en la solución del suelo, y en la planta.** Cuantificación inicial y final de manganeso, hierro y aluminio en la solución del suelo, y en la planta (actividad 5.7)

**Eventual efecto en la microflora.** La exudación de ácidos orgánicos en la rizósfera pudiera traducirse en alteraciones de la población de microorganismos que utilizarían estas fuentes carbonadas como sustrato. Su efecto, negativo o positivo sobre el ambiente, sin embargo, debiera evaluarse en el mediano a largo plazo, y no está considerado en este proyecto.

#### **Referencias**

Bourlaug, N.E. 2000. Ending world hunger: the promise of biotechnology and the thread of antiscience zealotry. *Plant Physiol.* 124:487-490.

Ellstrand, N.C. 2001. When transgenes wander, should we worry? *Plant Physiol* 125:1543-1545

James, C. 2000. Global review of commercialized transgenic crops. The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, N° 21 (<http://www.isaaa.org>)

Tilman, D. 1999. Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 96:5995-6000.





## Justificación de recursos solicitados a FIA

### 1. Recursos humanos.

**1.1. Profesionales.** De acuerdo a las bases, el proyecto contempla honorarios para el coordinador y coordinador alterno, los que se han calculado en el Cuadro 15.4.

**1.2. Técnicos.** Se considera la contratación de un técnico agrícola para desempeñar funciones en el CRI Carillanca, durante los años 2003, 2004 y 2005, a tiempo completo. Sus actividades corresponderán a la mantención de invernaderos, manejo de plantas transgénicas, y trabajo de laboratorio en general. Este técnico se desempeñara en INIA Carillanca, Temuco

**1.5. Contratación a honorarios de mano de obra calificada.** Se requerirán los servicios, preferentemente de estudiantes, para realizar actividades específicas dentro del objetivo N° 2. Estas actividades corresponden a los trabajos en la Fac. de Ciencias de la Universidad de Chile, por un período de 20 meses, con un costo de \$ 1.200.000 anual.

### 2. Equipamiento

#### 2.1.1. Equipos computacionales.

Se considera la adquisición de un CD writer para el procesamiento y almacenaje de imágenes de gran tamaño (superiores a 20 MG) frecuentemente utilizadas en citogenética. Para este propósito, se requiere alta velocidad de trabajo y almacenamiento digital de imágenes. El costo aproximado es de \$ 161.660.

#### 2.1. Adquisición de equipos.

##### 2.2.1. Equipos de laboratorio-

**HPLC.** La adquisición de un cromatógrafo líquido de alta resolución es la inversión de mayor monto que deberá realizar el proyecto (aproximadamente \$ 16 millones).. Este equipo no existe en el CRI Carillanca, y es fundamental para la cuantificación de ácidos orgánicos. Rutinariamente, las evaluaciones se han realizado mediante métodos enzimáticos, con un costo aproximado de \$ 2.000/muestra, separadamente para cada ácido (utilizando kit). El HPLC ofrece la ventaja de la precisión, rapidez y sensibilidad, permitiendo cuantificar una serie de ácidos orgánicos en forma paralela, imposible de realizar por otros métodos. En este proyecto se analizarán aproximadamente 4.000 muestras, correspondientes a ácidos orgánicos en tejidos radicales, y en exudados de variedades no transformadas, y en un número elevado de líneas transgénicas. Por el número de determinaciones necesarias de realizar, la cuantificación mediante métodos enzimáticos no es una opción factible para la ejecución del proyecto.

**Equipo de electroforesis.** Este equipo tiene un costo aproximado de \$ 1.400.000, y se pretende adquirir en el segundo año de ejecución del proyecto. Está destinado al Laboratorio de Biología Molecular de la Fac. de Ciencias de la Universidad de Chile, para realizar las actividades incluidas en el objetivo específico N° 2. Este tipo de equipo es de alta demanda en el trabajo rutinario de biología molecular, de manera que su disponibilidad a tiempo completo es una condición necesaria.





#### 4. Movilización, viáticos y combustibles

**4.1. Viáticos y pasajes nacionales** . Se consideran dos reuniones anuales de coordinación del grupo de trabajo, a realizarse alternadamente en Temuco, Santiago y Concepción, así como eventuales viajes del equipo de coordinación a Santiago o Concepción.

**4.2. Viáticos y pasajes nacionales** Se incluye también el costo del pasaje de un especialista en biobalística de CIMMYT durante el año 2003), y del Dr G. Neumann durante el año 2005. La invitación al Dr. Neumann coincidiría con la realización del seminario propuesto dentro de las modalidades de transferencia del proyecto.

**4.5 Combustibles.** Incluye las salidas a colecta de suelos y eventual traslado de los profesionales del CRI Carillanca que trabajarán en el proyecto. Este Centro de Investigación se ubica en el sector rural de Temuco, de difícil movilidad mediante locomoción colectiva. El problema se acentúa en períodos de trabajo que escapan a los horarios normales.

#### 5. Materiales e insumos.

**5.2. Insumos de laboratorio.** Este ítem representa el gasto de mayor magnitud en el costo total del proyecto. El monto se justifica por el elevado costo de los reactivos que se utilizan en biología molecular. Por citar sólo algunos ejemplos, la construcción de una genoteca tiene un costo aproximado de \$ 1.000.000 sólo en materiales; el fósforo radiactivo total a utilizar suma alrededor de \$ 2.000.000; los insumos para la pistola génica involucran un costo de \$ 4.000.000. A estos ejemplos se debe sumar los materiales para el cultivo de tejidos, para el "differential display, y para la identificación y aislamiento de promotores, entre los principales.

#### 7. Difusión.

##### 7.4. Seminarios.

El proyecto considera la realización de un seminario en el año 2005, con un costo de 2 millones de pesos.

##### 7.7. Otros.

Este ítem también incluye la atención a las visitas de estudiantes y agricultores, programadas dentro de las actividades de transferencia.

#### 8. Gastos Generales

**8.1. Consumos básicos.** Se contemplan los ítem de: luz, teléfono, fax y correspondencia. Estos se han estimado en función a un costo unitario mensual, determinado en función al gasto incurrido por estos conceptos en proyectos similares desarrollados por la institución postulante. Los consumos básicos corresponden a aquellos que se realizarán en el CRI Carillanca.

**8.2. Fotocopias.** Se contempla fotocopia de informes, artículos, documentos relacionados con la ejecución del proyecto, etc. Las fotocopias corresponden a aquellas que se consumirán en el CRI Carillanca.

**8.3. Materiales de oficina.** Considera tinta para impresora, hojas, disquetes, cuadernos de laboratorio, archivadores, y artículos de escritorio en general. Estos materiales corresponden a aquellos que se utilizarán en el CRI Carillanca.



## 16. ANÁLISIS ECONÓMICO DEL PROYECTO

### 16.1. Criterios y supuestos utilizados en el análisis

**Indicar criterios y supuestos utilizados en el cálculo de ingresos (entradas) y costos (salidas) del proyecto**

La racionalidad del análisis se basa en el impacto económico esperado por la reducción de la fertilización fosfatada en trigo, como consecuencia de la adopción de cultivares con habilidad para movilizar el P retenido en el suelo. El análisis considera como potenciales usuarios de la nueva tecnología, toda la superficie de trigo ubicada en suelos derivados de cenizas volcánicas entre la VII y la X regiones.

En promedio de las dos últimas temporadas agrícolas, la superficie de trigo sembrada en suelos volcánicos de la zona a que se hace referencia alcanzaría a 360.166 ha anuales. De esta superficie, aproximadamente el 15% (54.997 ha) corresponderían a siembras con semilla certificada (controlada por el Servicio Agrícola y Ganadero), y el 5,6% (20.000 ha) a semillas conocidas como "piratas", especialmente de origen francés. De este modo, la superficie total de trigo sembrada con semillas certificadas y no certificadas, alcanzaría a 74.977 ha, lo que correspondería al 20,8% del total de semillas utilizadas en la zona centro-sur y sur del país (Cuadro 1).

Cuadro 1. Superficie de trigo sembrada con semillas certificadas y no certificadas ("piratas") en la zona centro sur y sur de Chile (ha).

Región	1999 /00	2000 / 01	Promedio últimas dos temporadas.	Superficie con semilla certificada zona centro sur y sur (ha).	
				Hectáreas	%
VII	53.470	60.830	57.150	8.573	15
VIII	112.006	111.600	111.803	16.770	15
IX	160.663	166.970	163.817	25.525	15
X	24.942	29.250	27.396	4.109	15
<b>Total Zona Centro Sur y Sur</b>	<b>351.081</b>	<b>369.250</b>	<b>360.166</b>	<b>54.977</b>	
<b>País</b>	<b>391.580</b>	<b>414.000</b>	<b>402.790</b>		
Otras semillas no certificadas, especialmente var. Francesas usadas en la zona sur.				20.000	5.6
<b>TOTAL ZONA CENTRO SUR Y SUR</b>				<b>74.977</b>	<b>20.8%</b>





## Supuestos del análisis

- Para calcular la superficie total anual sembrada con la nueva semilla, se ha asumido que la distribución informal de semilla representa el doble de la semilla adquirida formalmente, y que es utilizada al año siguiente de su adquisición por el productor.
- La superficie potencial de uso de nuevas variedades inmediatamente posterior a su liberación, corresponde a 74.997 ha (base de la curva de adopción).
- El cambio de las semillas que usan los agricultores es gradual, de manera que la superficie de siembra de trigo en que es usado el nuevo producto tecnológico, se espera crezca en el tiempo, en la medida que este es conocido (evolución de la curva de adopción).
- El cambio de semilla podría aumentar el costo de producción del cultivo debido al incremento marginal en el precio de este insumo, asociado a su agregado tecnológico. Si un insumo es mejor que otro, el comprador está dispuesto a pagar un precio adicional, por lo que sería esperable que las nuevas semillas tengan un mayor precio que aquellas que actualmente se comercializan en el mercado. Este incremento se ha estimado en \$ 1.000/qqm, respecto al valor actual de la semilla certificada, y reflejaría el retorno a la inversión para producir dicha semilla.
- La dosis/ha de semilla se mantiene sin variación, y la dosis/ha de fósforo disminuye, sin afectar el rendimiento del cultivo. De este modo, el beneficio económico del uso del nuevo insumo tecnológico estaría dado por el ahorro de fertilizantes fosfatados, como consecuencia del uso más eficiente del fósforo retenido en el suelo. Puesto que se desconoce la cantidad posible de movilizar, se ha asumido que las plantas solubilizarán P en rangos fluctuantes entre 10 y 30% de sus necesidades. Esto se traduciría en reducciones de la fertilización fosfatada, proporcionales a la movilización.

De esta manera, el beneficio de la innovación estaría dado por la expresión:

$$B = (QP_i - QP_f) * \$P * S, \text{ donde:}$$

B = Beneficio económico de la innovación en \$.

QP<sub>i</sub> = Cantidad de kilos de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> por ha usado antes de incorporar la nueva semilla

QP<sub>f</sub> = Cantidad de kilos de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> por ha usado con la nueva semilla.

\$P = Precio del kilo de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

S = Superficie en que es usada la nueva semilla.

Por otra parte, el costo de la innovación estaría dado por la expresión:

$$C = (C_f - C_i) * Q_s * S, \text{ donde:}$$

C = Costo de la innovación en \$.

C<sub>f</sub> = Costo de la semilla nueva, mejorada por transgénesis.

C<sub>i</sub> = Costo de la semilla sin mejorar.

Q<sub>s</sub> = Cantidad de semilla por ha.



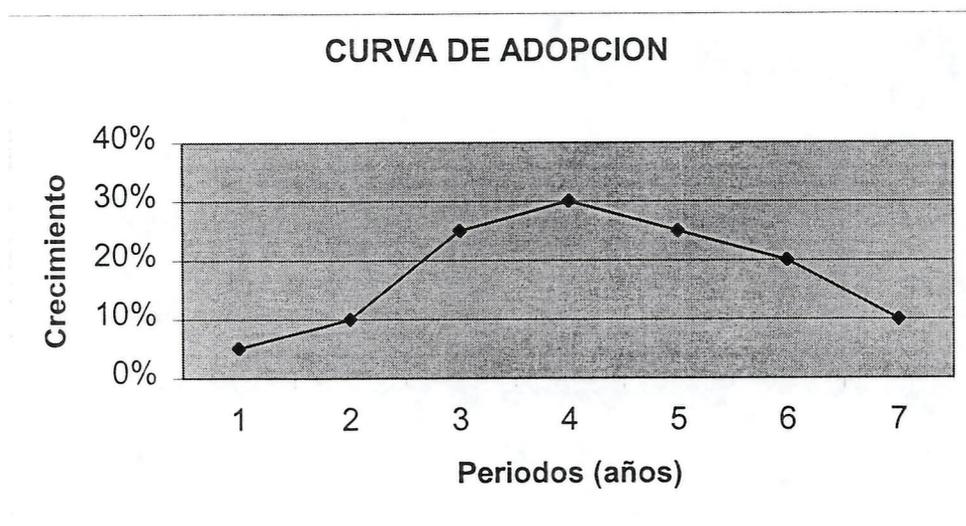


### Evaluación económica del proyecto.

La curva de adopción de la nueva tecnología se inicia asumiendo que el 5 % de la superficie que se siembra con semilla certificada y no certificada indicada en el Cuadro 1 (74.997 ha), se sembrará con la variedad mejorada mediante transgénesis, para alcanzar un crecimiento anual del 30% al cuarto año posterior a su liberación.

Por otra parte, se ha considerado que la nueva semilla se distribuye entre los productores de trigo de manera informal, procedimiento que si bien es ilegal, representa una situación real de uso de semilla en trigo. Se ha supuesto que por cada hectárea de trigo sembrado con la nueva semilla, al año siguiente se sembrará dos hectáreas adicionales con la variedad, pero no certificada. De este modo, la superficie sería de 3.700 ha el primer año, para alcanzar hasta 281.000 ha al octavo año. De acuerdo a esta curva de adopción, al octavo año se alcanzaría a cubrir el 78 % de la superficie de trigo sembrada con la nueva semilla en la zona centro-sur y sur del país (Cuadro 3). La proporción restante correspondería a agricultores que tradicionalmente han utilizado una misma variedad, reticentes al cambio

Figura 1. Curva de adopción de la nueva tecnología



Para efectos de cálculo, se ha utilizado una dosis de fósforo de 100 kilos de  $P_2O_5$  por hectárea, en la situación sin proyecto. Esta estimación se basa en una dosis promedio de fertilización fosfatada en trigo para las regiones VII a X, a un precio de \$ 280 por kg de  $P_2O_5$  utilizado.

Se ha supuesto un incremento de precio de la semilla transgénica de 1.000 por qqm. El "royalty" de la semilla de trigo certificada actual es del orden de 2.000 \$/qqm.





Para que los productores de trigo adopten la nueva variedad, el beneficio debe ser mayor al costo. Si se considera un incremento del precio de la semilla transgénica de \$1.000 por qqm (i.e. aproximadamente \$2.000 por hectárea), el beneficio debe ser mayor a este valor. Si la cantidad de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> disminuida fuera de 5 kilos/ha (ie. 5% de P movilizado) a un precio de \$280/kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, el ahorro sería de \$1.400 por hectárea, es decir, menor que el costo, por lo que no sería conveniente la innovación.

La evaluación económica del proyecto se ha hecho a través del Valor Presente Neto, a una tasa de descuento del 12 % anual. Como se ha supuesto que el crecimiento de la superficie sembrada con la nueva variedad de trigo se estabiliza al octavo año, y después se mantiene en el tiempo, el flujo de caja de este año se ha tratado como una perpetuidad, por la expresión FC/r, donde r es la tasa de descuento.

Considerando como estándar una disminución de la dosis de 15 kg/ha P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (ie. 15 % de P movilizado) por efecto del uso de la semilla transgénica, y un incremento en su costo de \$2.000 por ha, el VPN(12%) alcanzaría a \$5.300 millones (Cuadro 3). Este valor correspondería a \$3.170 millones, si la disminución de la dosis de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> fuera de 10 kilos/ha(10% de P movilizado), y a \$7.436 millones si dicha disminución alcanzara a 20 kilos/ha (20% de P movilizado), respectivamente. Si el incremento del costo de la semilla fuera nulo, el rango de variación del VPN (12%) sería de \$4.265 a \$ 12.795 millones (Cuadro 2).

De acuerdo al monto de los valores estimados en el análisis económico, el proyecto es altamente rentable. Los beneficiados serían agricultores de todos los tamaños de propiedad de las diferentes regiones involucradas. Puesto que los agricultores con superficies de menor tamaño representan el mayor número de las explotaciones dedicadas al cultivo del trigo, el proyecto tendría un fuerte impacto social.

Cuadro 2. Análisis de sensibilidad del proyecto a variables críticas. (Valor Presente Neto del proyecto, en \$).				
Incremento del costo de la semilla (\$/qqm)	Niveles de reducción (kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> / ha) <sup>(1)</sup>			
	30	20	15	10
0	\$ 12.795.148.763	\$ 8.530.099.175	\$ 6.397.574.382	\$ 4.265.049.588
1.000	\$ 11.701.546.305	\$ 7.436.496.717	\$ 5.303.971.923	\$ 3.171.447.129

(1) Corresponde a la reducción de la fertilización fosfatada, considerando como 100 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. El cálculo asume que estos niveles de reducción son iguales a la movilización de P desde el suelo, sin efectos sobre el rendimiento.



## **16.2. Flujo de Fondos del Proyecto e Indicadores de Rentabilidad (calcular el VAN y la TIR dependiendo del tipo de proyecto)**

El presente proyecto no contempla inversión en sus flujos anuales. Los flujos a través de los años considerados son todos positivos, de manera que la TIR se hace infinita, y su valor no es un indicador válido de considerarse en el presente análisis.

El flujo de fondos del proyecto e indicadores de rentabilidad se presentan adjuntos en la hoja siguiente (archivo Excel). En éste se ha considerado como ejemplo el flujo de fondos para un 15% de reducción en la dosis de  $P_2O_5$ , correspondiente a una estimación de movilización de P de equivalente al 15% las necesidades del cultivo. En el Cuadro 2 se presenta el indicador de rentabilidad, para rangos de movilización de P fluctuantes entre 10 y 30%





Cuadro 3. Flujo de Fondos del Proyecto e Indicadores de Rentabilidad.		Ahorro de 15 kilos de P2O5 / ha (15 % de incremento de costo de la semilla de 1.000 \$ / qqm.						
Periodos	1	2	3	4	5	6	7	8
Curva de adopción (Base 74.977 ha) (1)	5%	10%	25%	30%	0	20%	10%	0%
Incremento anual superficie con nueva semilla certificada	3.748,9	7.497,7	18.744,3	22.493,2	18.744,3	14.995,5	7.497,7	0,0
Incremento anual superficie con nueva semilla no certificada (2)		7.497,7	14.995,5	37.488,7	44.986	37.488,7	29.990,9	14.995,5
Superficie con nueva semilla certificada.	3.748,9	11.246,6	29.990,9	52.484,1	71.228	86.224,0	93.721,7	93.721,7
Superficie con nueva semilla no certificada	0,0	7.497,7	22.493,2	59.981,9	104.968	142.457,0	172.447,9	187.443,4
<b>Superficie total con nueva semilla(ha)(3)</b>	<b>3.748,9</b>	<b>18.744,3</b>	<b>52.484,1</b>	<b>112.466,0</b>	<b>176.197</b>	<b>228.680,9</b>	<b>266.169,6</b>	<b>281.165,1</b>
<b>BENEFICIO (\$) (4)</b>	<b>15.745.244</b>	<b>78.726.218</b>	<b>220.433.409</b>	<b>472.357.305</b>	<b>740.026.445</b>	<b>960.459.854</b>	<b>1.117.912.289</b>	<b>1.180.893.263</b>
<b>COSTO(\$)(5)</b>	<b>7.497.735</b>	<b>22.493.205</b>	<b>59.981.880</b>	<b>104.968.290</b>	<b>142.456.965</b>	<b>172.447.905</b>	<b>187.443.375</b>	<b>187.443.375</b>
Cantidad de semilla certificada afecta a sobreprecio(qqm)	7.498	22.493	59.982	104.968	142.457	172.448	187.443	187.443
<b>BENEFICIO - COSTO</b>	<b>8.247.509</b>	<b>56.233.013</b>	<b>160.451.529</b>	<b>367.389.015</b>	<b>597.569.480</b>	<b>788.011.949</b>	<b>930.468.914</b>	<b>993.449.888</b>

<b>VPN (12%)</b>	<b>\$ 5.303.971.923</b>
12%	

- 1, La curva de adopción es el crecimiento anual que tendría el uso de semilla transgénica. Se ha supuesto que al séptimo año se estabiliza la superficie sembrada con la nueva semilla.
- 2, Se ha supuesto que la semilla transgénica es usada en una superficie DOS veces superior a la superficie original sembrada con semilla certificada, con un año de desfase. Esta sería la semilla no certificada que se usa en los predios que la producen y que además se comercializa entre productores de trigo.
- 3, La superficie total de trigo sembrado con semilla transgénica está compuesta por aquella sembrada con semilla certificada más la no certificada.
- 4, El beneficio se obtiene de la diferencia en la cantidad de fósforo a aplicar por ha multiplicado por el precio y por la superficie de siembra de la semilla transgénica. Se consideró un costo de 280 \$/kilo de P2O5.
- 5, El costo estaría dado por el incremento del precio de la semilla transgénica certificada, multiplicado por la cantidad vendida (Superficie en ha por 2 qqm/ha). Este valor reflejaría el costo de la inversión hecha para obtener la semilla transgénica. Se ha considerado un costo de 1,000 por qqm.
- 6, El Valor Presente Neto (VPN) se ha obtenido de actualizar el flujo de caja a una tasa de descuento del 12%. A partir del año 7, se consideró que la superficie de trigo en que es usada la semilla transgénica se estabiliza, y el flujo de caja del año 8 es tratado como una perpetuidad. (FC / r).





## 16. RIESGOS POTENCIALES Y FACTORES DE RIESGO DEL PROYECTO

### 17.1. Técnicos

- **Promotores de Arabidopsis, no funcionales en trigo.** Los promotores de los genes que codifican para un transportador de fosfato de alta afinidad (AtPT1) y para la enzima alcalina fosfatasa (AP) de una especie dicotiledonea (Arabidopsis), pudieran no ser funcionales en una monocotiledonea (trigo). La explicación técnica a esta disfuncionalidad estaría asociada al requerimiento de factores de transcripción específicos para cada uno de ellos, y que pudieran no estar presentes en el genoma del trigo.
- **La expresión del gen TaPT1 de trigo, no es específica de raíces.** La expresión de este gen no se ha evaluado funcionalmente, y solo se dispone de su secuencia nucleotídica. Considerando que todos los transportadores de fosfato de alta afinidad descritos a la fecha se expresan en raíces y son regulados por P, es altamente probable que así también ocurra con el gen TaPT1. Sin embargo, su funcionalidad en trigo (ie. especificidad en raíces, y de expresión modulada por P), requiere ser demostrada.
- **Baja eficiencia de transformación de variedades de trigo chilenas.** La eficiencia de transformación en trigo está directamente asociada con la receptividad del genotipo. Aun cuando se han logrado notables avances respecto a la estandarización de la técnica de transformación de trigo en el CIMMYT (México) con la variedad Bob white, se desconoce la eficiencia de transformación de las variedades chilenas.
- **Plantas transformadas con el gen de la PEPC, no exudan cantidad suficiente de ácidos orgánicos.** Si bien se dispone de numerosos antecedentes sobre transgénesis con el gen de la PEPC, no existen evidencias publicadas respecto a su utilización dirigida a acumular y exudar ácidos orgánicos en la rizósfera. Llama la atención, sin embargo, los trabajos realizados con este propósito con la citrato sintasa (discutido en la justificación del proyecto), una enzima sin función de carboxilación y, por lo tanto, imposible que contribuya a reemplazar el carbono exudado como ácidos orgánicos. Precisamente, ésta es la función de la PEPC de raíces. De acuerdo a la información proporcionada por el Dr. Neumann (G. Neumann, U. de Hohenheim, Alemania), la estrategia propuesta en este proyecto se está utilizando actualmente en U.S.A. y Alemania. El grupo de Johnson (U. de Minnessota, U.S.A.) introdujo la PEPC en alfalfa, logrando un incremento significativo en la producción de malato, pero no de citrato. Esta información (no publicada aún) sustentaría la factibilidad técnica de nuestra propuesta
- **Plantas transformadas con otros genes de lupino no se establecen adecuadamente en suelos bajos en P disponible.** Si esto ocurriera, indicaría que los transgenes no participan directamente en el ciclo del carbono en raíces. Puesto que éstos corresponden a genes que se expresan en tejidos que exudan citrato en respuesta a la deficiencia de P, probablemente cumplirían una función esencial para mantener activo el mecanismo de exudación en la planta. Ejemplos de este tipo están representados por el gen *sqdx* (sonda cDNA disponible para el proyecto), que participa en el reciclaje de P desde fosfolípidos de membrana, y que representan genes potenciales de ser incorporados en plantas transgénicas con PEPC.





### **17.2. Económicos**

Por la naturaleza del proyecto, no se visualizan riesgos económicos para su ejecución

### **17.3. Gestión**

No se visualizan riesgos de gestión

### **17.4. Otros**





### 17.5. Nivel de Riesgo y Acciones Correctivas

Riesgo Identificado	Nivel Esperado	Acciones Propuestas
Promotores de Arabidopsis no funcionales en trigo	Al menos uno de los dos es funcional	<ol style="list-style-type: none"><li>Se buscarán otros promotores que puedan describirse en la literatura</li><li>Identificar un promotor propio de trigo</li></ol>
La expresión del gen TaPT1 de trigo no es específica de raíces	Se espera que sea específico de raíces y regulado por fósforo	<ol style="list-style-type: none"><li>Aun cuando no fuera específico de raíces, pero regulado por fósforo, será de utilidad para evaluar la función de la PEPC, y de otros genes de lupino en trigo. Sin embargo, no sería adecuado para generar un cultivar comercial</li><li>Hacer experimentos de "differential display" en trigo para identificar genes regulados por fósforo, y específicos de raíces</li></ol>
Baja eficiencia de transformación de variedades de trigo chilenas	Alrededor de un 2% de eficiencia	<ol style="list-style-type: none"><li>Evaluar otras variedades de trigo chilenas</li><li>Utilizar la variedad de trigo Bob white, de alta eficiencia de transformación mediante biobalística</li></ol>
Plantas transformadas con PEPC no exudan cantidades suficiente de ácidos orgánicos	Al menos un evento de transformación genera una planta que exuda ácidos orgánicos	<ol style="list-style-type: none"><li>Introducir el gen de la citrato sintasa para dirigir el flujo de carbono desde oxaloacetato a citrato</li><li>Necesidad de introducir otros genes asociados con la estrategia de exudación</li></ol>
Plantas transformadas con otros genes de lupino no se establecen adecuadamente en suelos bajos en P disponible	Al menos uno de los tres genes seleccionados contribuye a aumentar la capacidad de la planta para crecer en suelos bajos en P disponible	<ol style="list-style-type: none"><li>Evaluar otros genes aislados de lupino blanco</li></ol>





## 18. ESTRATEGIA DE TRANSFERENCIA DE RESULTADOS

Se visualiza que los resultados no estarán disponibles para la transferencia a los usuarios dentro del plazo de su ejecución. A diferencia de los avances mundiales de investigaciones biotecnológicas dirigidas a resolver estreses bióticos, no existen actualmente en el mundo plantas transformadas con tolerancia a la deficiencia de P que se estén cultivando comercialmente.

No obstante lo anterior, se consideran 3 modalidades de transferencia que incluyen: sensibilización de la opinión pública al concepto de plantas genéticamente modificadas, realización de un seminario, y publicaciones científicas y divulgativas.

1. **Sensibilización a la opinión pública.** Tomando en cuenta que la propuesta plantea la utilización de transgénesis en plantas, y el eventual rechazo de la comunidad al desarrollo de productos transgénicos, la propuesta considera un programa de información dirigido a sensibilizar a la opinión pública respecto de los productos agrícolas genéticamente modificados. Para lograr este objetivo, se invitarán a 12 cursos de enseñanza media a conocer los laboratorios e invernaderos donde se ejecutará este proyecto, visita que se complementará con una charla sobre biotecnologías. Estos cursos serán seleccionados entre las comunas de IX Región, esperando cubrir un público objetivo de alrededor de 500 alumnos. El programa se hará extensivo a organizaciones de agricultores de la IX Región, con un público objetivo de aproximadamente 200 agricultores.
2. **Seminario técnico.** La propuesta contempla la preparación y ejecución de un seminario a desarrollarse en el CRI-Carillanca, IX Región. Esta actividad se realizará en el año 2005, y contará con la participación de investigadores nacionales, y de los investigadores directamente involucrados en la ejecución del proyecto, y eventualmente de un expositor extranjero. Este seminario se financiará parcialmente con fondos del proyecto
3. **Publicaciones científicas y divulgativas.** Se considera la publicación de artículos científicos en revistas internacionales, y divulgativos en revistas nacionales y de circulación regional.

La estrategia del uso de la PEPC de lupino blanco para introducir en trigo la habilidad de solubilizar el P retenido en el suelo, así como los genes y promotores que se generarán en este proyecto, son susceptibles de patentamiento. El patentamiento es una opción de transferencia de resultados, sirviendo adicionalmente como mecanismo de protección de inventos tecnológicos. Dado que la concreción de una patente requiere tiempo (1 a 2 años) e involucra un alto costo (2 a 3 millones de pesos), se considera realizable dentro del contexto de una segunda parte de esta línea de trabajo.





## 19. CAPACIDAD DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO

### **19.1. Antecedentes y experiencia del agente postulante y agentes asociados**

*(Adjuntar en Anexo B el Perfil Institucional y documentación que indique la naturaleza jurídica del agente postulante)*

INIA Carillanca dispone actualmente tanto de profesionales especializados en el tema, como de las herramientas biotecnológicas que se utilizarán para realizar la propuesta. Las especialidades incluyen fertilidad de suelos, fisiología molecular, biología molecular, cultivo de tejidos, citología molecular y transformación de trigo mediante biobalística. Para aquellas actividades de las cuales no se dispone de la experiencia necesaria, el proyecto considera la participación de profesionales de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, y del Depto. de Botánica de la Universidad de Concepción.

En forma complementaria se mantienen contacto permanente con profesionales actualmente trabajando en las áreas de transformación de cereales mediante biobalística (Dra. Silvia Travella, Universidad de Zurich, Suiza), y fisiología molecular del estrés inducido por deficiencias de fósforo (Dr. Gunter Neumann, Universidad de Hohemheim, Alemania). Ambos investigadores han manifestado su intención de colaborar en este proyecto.





## 19.2. Instalaciones físicas, administrativas y contables

### 1. Facilidades de infraestructura y equipamiento importantes para la ejecución del proyecto.

Esta propuesta se desarrollará en el Centro Regional de Investigación Carillanca (Temuco), en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile (Santiago), y en el Depto. de Botánica de la Universidad de Concepción, Concepción.

INIA Carillanca dispone de laboratorios equipados para trabajos en biología molecular, ingeniería genética, y transformación de plantas. Entre los principales equipos, se cuenta con un secuenciador automático, una unidad de biobalística para transformación genética, termocicladores, cámaras de flujo laminar, microscopio de epifluorescencia, sala de radiactividad, sala de cultivo de tejidos, cámaras de incubación con temperatura controlada, cuarto fotográfico, invernaderos y refrigerador  $-70^{\circ}\text{C}$ , entre otros.

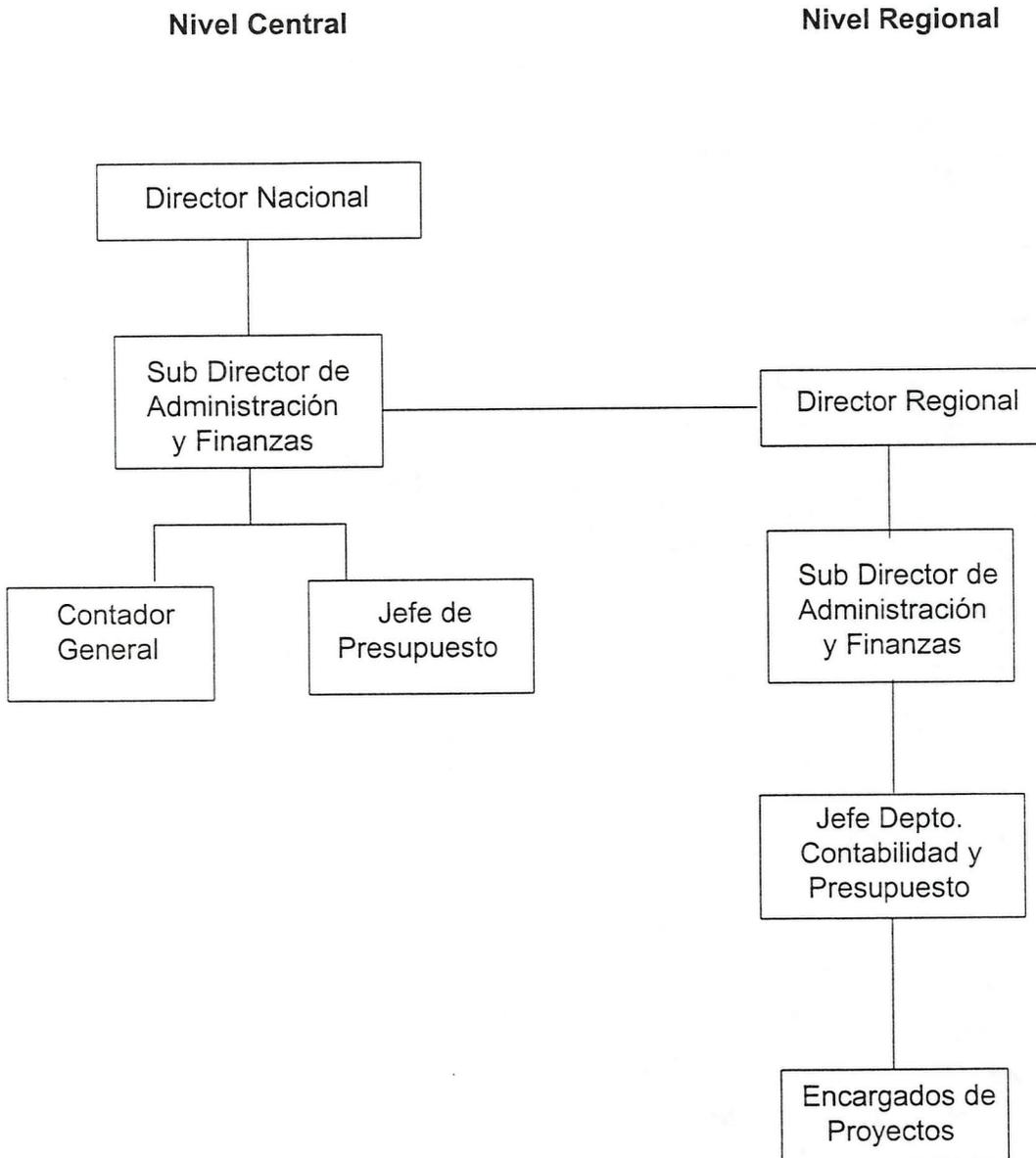
Los laboratorios que colaborarán en el desarrollo de la propuesta (Lab. de Genética Molecular Vegetal, Fac. Ciencias, Universidad de Chile, y Lab. de Fisiología Vegetal del Depto. de Botánica de la Universidad de Concepción), están equipados adecuadamente para realizar los trabajos comprometidos en este proyecto.





## 2. Capacidad de gestión administrativo-contable.

Toda las actividades de gestión del proyecto se concentrarán en INIA-Carillanca. Este Centro de Investigación dispone de un Depto. de Contabilidad, que permitirá realizar la gestión contable del proyecto en forma independiente del nivel central de INIA. La estructura administrativo-contable de INIA se esquematiza a continuación.





## 20. OBSERVACIÓN SOBRE POSIBLES EVALUADORES

*(Identificar a el o los especialistas que estime inconveniente que evalúen la propuesta. Justificar)*

Nombre	Institución	Cargo	Observaciones





## ANEXO A

### ANTECEDENTES DEL EQUIPO DE COORDINACIÓN Y EQUIPO TÉCNICO DEL PROYECTO





## ANEXO B

### ANTECEDENTES DEL AGENTE POSTULANTE Y CARTAS COMPROMISO

