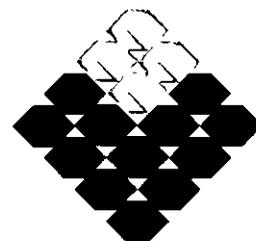


CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACION CARILLANCA  
TEMUCO - IX REGION DE LA ARAUCANIA



GOBIERNO DE CHILE  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
AGROPECUARIAS

FUNDACION PARA LA  
INNOVACION AGRARIA

## ***INFORME FINAL***

Del proyecto

### ***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***

Código FIA: BIOT-01-A-36

**INIA-CRI CARILLANCA**

Diciembre 2006

TEMUCO-CHILE



<b>OFICINA DE PARTES - FIA</b>	
<b>RECEPCIONADO</b>	
Fecha	02 ENE. 2007
Hora	11:40
Nº Ingreso	37

## INFORME TECNICO Y DE GESTION FINAL

### I. ANTECEDENTES GENERALES

Código: BIOT-01-A-36

Nombre del proyecto: 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

Regiones de ejecución: Novena Región, Octava Región y Región Metropolitana

Agente ejecutor: Instituto de Investigaciones Agropecuarias.  
Centro Regional de Investigación Carillanca

Agentes asociados: No hay

Coordinador del proyecto: Enrique Peñaloza Hernández

Costo total programado:

Costo total real:

Aporte FIA programado:

Aporte FIA real:

Período de ejecución programado: Diciembre de 2001 a Diciembre de 2005

Período de ejecución real: Diciembre de 2001 a Diciembre de 2006

## II. RESUMEN EJECUTIVO

*El presente documento corresponde al Informe Final del proyecto “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”. Este proyecto tuvo como objetivo desarrollar trigos con habilidad para movilizar el fósforo inorgánico retenido en los suelos, posible de lograr en plantas que acumulen y exuden ácidos orgánicos en la rizósfera. Con este objetivo, se transformó trigo con los genes que codifican para las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato dehidrogenasa (MDH), separados y co-integrados, en ambos casos modulados por un promotor raíz-específico e inducible por la deficiencia de fósforo.*

*Entre los principales logros del proyecto se indican la propiedad de una librería de expresión de genes y el aislamiento de 30 secuencias de genes que se expresan en respuesta a la deficiencia de fósforo, de los cuales se obtuvo el cADN completo en siete de ellos (objetivo específico 1), el clonamiento de tres promotores raíz-específicos e inducibles por la deficiencia de fósforo (objetivo específico 2), la capacidad instalada para transformar trigo (objetivo específico 3), la expresión heteróloga en trigo, demostrada a través de la funcionalidad de promotores de dicotiledóneas en monocotiledóneas (objetivo específico 4), y el desarrollo de plantas de trigo transformadas con el gen de la PEPC y de la MDH, y de ambos co-integrados en el genoma de esta especie (objetivos específicos 5 y 6).*

*En condiciones de hidroponía, se demostró que las plantas transgénicas acumulan y exudan malato en cantidades significativamente superiores al trigo no transformado. Establecidas en suelo, sin embargo, estas plantas muestran los síntomas característicos de la deficiencia de fósforo, lo que sugeriría que la cantidad de exudados radicales es insuficiente para lograr una eficiente movilización de este nutriente. Evidencia reciente indica que exudación de ácidos orgánicos en la rizósfera pudiera estar determinada por la presencia de canales iónicos, y que la absorción del fósforo movilizado por los ácidos orgánicos puede facilitarse con la incorporación de proteínas transportadoras. Estos nuevos elementos pueden sinergizar la estrategia inicialmente planteada y desarrollada en este proyecto.*

*La ejecución del proyecto no se ajustó al cronograma inicial debido a la necesidad de mejorar metodologías y estrategias de acuerdo a la información del momento. Es el caso del clonamiento de tres isogenes PEPC, del aislamiento de nuevos promotores, o de la incorporación de nuevos elementos a las construcciones génicas, como la adición de intrones con el propósito de incrementar la expresión de transgenes. Estas modificaciones permiten explicar la extensión en la duración del proyecto respecto a los plazos iniciales, las que se realizaron sin alterar el presupuesto comprometido. Si bien estos resultados dan por concluido el estudio en sus aspectos formales y contractuales, su ejecución ha iniciado en el país una línea de investigación de relevancia y a la que se le debe dar continuidad.*

**Reconocimiento:** *El equipo técnico que participó en la ejecución de este proyecto desea agradecer a la Fundación para la Innovación Agraria y al Instituto de Investigaciones Agropecuarias por el apoyo y financiamiento de esta investigación.*

### III. INFORME TÉCNICO

#### 1. OBJETIVOS DEL PROYECTO

El objetivo general del proyecto consistió en integrar genes de lupino en el genoma del trigo mediante biobalística, con el propósito de desarrollar trigos con habilidad para movilizar el fósforo inorgánico retenido en los suelos del centro-sur y sur de Chile. Este objetivo general se cumplió a través de la ejecución de seis objetivos específicos, cuyos resultados, impactos y cuantificación relativa de cumplimiento se indican a continuación.

**1. Aislar y caracterizar genes asociados con la exudación de citrato en *Lupinus albus*.** Se aislaron, clonaron y secuenciaron, y se confirmó la expresión de 30 genes parciales desde tejidos que exudan citrato en respuesta a la deficiencia de fósforo. Como productos adicionales generados en esta actividad, se dispone de una librería de expresión de genes construida desde el tejido modelo, y del largo completo de la región codificante de siete de ellos. Entre éstos se incluye tres isogenes fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC36, PEPC41 y PEPC54), una malato dehidrogenasa, una ascorbato peroxidasa, un transportador de fosfato de alta afinidad y una sulfolípido sintasa. Tres de estos genes (isogenes fosfoenolpiruvato carboxilasa) se incorporaron a la base de datos del GenBank. *De acuerdo a los resultados esperados, las actividades de este objetivo específico permitieron aislar 30 genes y caracterizar siete, de un total de diez comprometidos como meta final y uno como meta parcial.*

**2. Identificar promotores funcionales en trigo, específicos de raíces y modulados por la disponibilidad de fósforo.** Con el propósito de identificar promotores para dirigir la expresión de genes de lupino en trigo, en esta actividad se aislaron cinco promotores de plantas modulados por fósforo. Cuatro de estos corresponden a promotores de transportadores de fosfato de alta afinidad aislados desde *Arabidopsis* (AtPT1 y AtPT2) y desde trigo (TaPT1 y TaPT2), en tanto que uno corresponde al promotor de la fosfatasa ácida de *Arabidopsis* (PAP-1). *De acuerdo a los resultados esperados, las actividades de este objetivo específico permitieron clonar cinco promotores, de un total de tres comprometidos como meta final y uno como meta parcial.*

**3. Optimizar la transformación genética de variedades elite de trigo chilenos mediante biobalística.** En esta actividad se estandarizaron las condiciones para transformar trigos mediante biobalística. Incorporando modificaciones a metodologías utilizadas por CIMMYT, se transformó eficientemente el cultivar de trigo modelo Bobwhite, y las variedades chilenas Dalcahue y Dollinco. Debido principalmente a diferencias en la capacidad de regeneración y precocidad, se seleccionó el cv. Bobwhite para realizar todos los estudios de integración de genes de lupino en trigo. *Las actividades de este objetivo específico permitieron transformar trigo Bobwhite y dos cultivares de trigo chileno, de uno comprometido como meta final y parcial.*

**4. Evaluar la funcionalidad en trigo, de promotores aislados desde *Arabidopsis* y trigo.** Utilizando RT-PCR, fluorometría y tinción histoquímica para detectar expresión de transcritos, actividad enzimática *in vitro* y tinción enzimática *in vivo*, respectivamente, en esta actividad se demostró la funcionalidad en plantas de trigo, de los promotores de *Arabidopsis* (AtPT1 y AtPT2) y de trigo (TaPT2) fusionados al gen reportero *gus*. De acuerdo a los resultados de funcionalidad de plantas establecidas tanto en suelo como en hidroponía, finalmente se seleccionó el promotor AtPT2 para dirigir la expresión de genes de lupino en trigo. *De acuerdo a los resultados esperados, las actividades de este objetivo específico permitieron demostrar la funcionalidad en trigo de tres promotores, de uno comprometido como meta final y parcial.*

**5. Transformar trigo con el gen de la PEPC de *L. albus*.** Se transformó trigo Bobwhite con la región codificante del gen PEPC, modulada por el promotor AtPT2 fusionado al intrón *adh1* de maíz, utilizando *NosT* como región de término de la transcripción (AtPT2-*adh*-PEPC-*nosT*). Adicionalmente, también se transformó trigo con la misma construcción, sin el intrón (AtPT2-PEPC-*nosT*). En ambas construcciones, la transformación se realizó con PEPC36, entre tres isógenos PEPC identificados en el objetivo específico 1 de este proyecto (PEPC36, PEPC41 y PEPC54). La generación T<sub>2</sub> se evaluó en hidroponía, demostrándose que plantas de trigo transgénico exudaron y acumularon malato en el tejido, en cantidades significativamente superiores al control no transformado. *De acuerdo a los resultados de este objetivo específico, las tasas de exudación de malato y concentración de malato en el tejido de plantas transgénicas (PEPC36) fueron significativamente superiores a los indicadores establecidos como meta final (20%) y parcial (10%).*

**6. Transformar trigo con otros genes de *L. albus*.** Se transformó trigo Bobwhite con la región codificante de la enzima malato dehidrogenasa (MDH) modulada por el promotor AtPT2 fusionado al intrón *adh1* de maíz, utilizando *NosT* como región de término de la transcripción (AtPT2-*adh*-MDH-*nosT*). Adicionalmente, también se transformó con la misma construcción sin el intrón *adh* (AtPT2-MDH-*nosT*), así como con los genes PEPC36 y MDH co-integrados en el genoma Bobwhite sin intrón (AtPT2-PEPC36-*nosT* y AtPT2-MDH-*nosT* y con intrón (AtPT2-*adh*-PEPC36-*nosT* y AtPT2-*adh*-MDH-*nosT*). La generación T<sub>2</sub> se evaluó en hidroponía, demostrándose que plantas de trigo transgénico exudaron y acumularon malato en el tejido, en cantidades significativamente superiores al control no transformado. *De acuerdo a los resultados de este objetivo específico, las tasas de exudación de malato y concentración de malato en el tejido de plantas transgénicas (MDH y PEPC36) fueron significativamente superiores a los indicadores establecidos como meta final (20%) y parcial (10%).*

## **2. METODOLOGIAS DEL PROYECTO**

### **OBJETIVO ESPECÍFICO 1**

#### **ACTIVIDAD 1.1. Diseño y construcción de partidores**

##### **1.1.1. Descripción de la metodología utilizada**

Las raicillas proteoideas corresponden al tejido donde ocurre la exudación de ácidos orgánicos en *Lupinus albus* y, por lo tanto, donde se expresan los genes que interesa transferir a trigo. Con el propósito de identificar genes que se expresan diferencialmente en este tejido radical, se diseñaron 24 partidores arbitrarios y tres partidores de anclaje (oligo-dTs). El diseño incorporó un sitio *HindIII* en el extremo 5' para facilitar la liberación del fragmento clonado.

##### **1.1.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas durante el desarrollo de esta actividad.

##### **1.1.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

La actividad se desarrolló de acuerdo a lo programado, sin modificaciones de relevancia.

#### **ACTIVIDAD 1.2. Crecimiento de plantas y extracción de ARN**

##### **1.2.1. Descripción de la metodología utilizada**

Se estableció un cultivo de *L. albus* en solución nutritiva en ausencia de fósforo (P). Esta actividad tuvo como objetivo obtener ARN mensajero (ARNm) desde tejidos radicales que exudan ácidos orgánicos en respuesta a la deficiencia de P, en cantidad suficiente para construir una genoteca de expresión, y para los estudios de "differential display".

Semillas de *L. albus* cv. Victoria Baer se desinfectaron superficialmente y germinaron. Las plántulas se trasplantaron a envases de 42 L conteniendo solución nutritiva basal pH 5,8 mantenida con aireación permanente, en ausencia P. El tejido radical se cosechó transcurridos 24 días, período durante el cual las plantas desarrollaron suficientes raíces proteoideas. Desde las raíces proteoideas se aislaron los conglomerados de raicillas proteoideas maduras, las que se molieron en nitrógeno líquido y almacenaron hasta su utilización. La extracción de ARN total se realizó utilizando el reactivo de Chomzinski con fenol, visualizándose la integridad del ARN en geles de agarosa-formaldehído, y cuantificándolo espectrofotométricamente.

##### **1.2.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas durante el desarrollo de esta actividad.

##### **1.2.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Esta actividad se realizó de acuerdo al protocolo previamente establecido.

## **ACTIVIDAD 1.3. "Differential display" de ARN mensajeros**

### **1.3.1. Descripción de la metodología utilizada**

Se realizaron los experimentos de "differential display" dirigidos a identificar genes que se inducen o reprimen en respuesta al estrés inducido por la deficiencia de P en *L. albus*. El principio básico de la técnica consiste en la transcripción reversa de una población de ARNm capturados por un partidor de anclaje (oligo-dT) que contiene una ó dos bases adicionales en su extremo 3', suficiente para proveer de especificidad. Los productos de la transcripción reversa son amplificados por PCR, utilizando el partidor de anclaje junto a un partidor de secuencia arbitraria. La combinación de ambos partidores genera finalmente sub-poblaciones de ARNm, los que son separados por tamaño en geles denaturantes.

En este estudio se utilizaron 3 oligo-dTs y 24 partidores arbitrarios, lo que permitió analizar 72 combinaciones para cada muestra de ARN. Los partidores se diseñaron incluyendo un sitio de restricción *HindIII* en el extremo 5' para facilitar la recuperación del fragmento clonado. Con el propósito de reducir el número de reacciones de transcripción reversa, minimizar la redundancia y la escasa representación de ciertos ARNm, los partidores arbitrarios se diseñaron con sólo una base de anclaje en el extremo 3'. Los experimentos se realizaron utilizando ARN total extraído desde plantas de *L. albus* mantenidas en invernadero. Las plántulas se transplantaron a contenedores de 42 L de capacidad rellenos con solución nutritiva basal. Todas las plantas se mantuvieron en ausencia de P, agregándose 0,1 mM P a la mitad de los contenedores, 24 días después del trasplante.

El tejido se cosechó a las 72 h de agregado 0,1 mM P, a plantas mantenidas en ausencia de P por 24 días. El ARN total se obtuvo desde conglomerados de raicillas proteoideas maduras, y que corresponden a aquellos donde ocurre exudación de citrato en *L. albus*. Los conglomerados se cortaron de la raíz proteoidea con un bisturí e inmediatamente se depositaron en un mortero conteniendo nitrógeno líquido. Una vez eliminados los trozos de raíz primaria y evaporado el nitrógeno líquido, el tejido restante (raicillas proteoideas) se maceró y almacenó en tubos de microcentrifuga a  $-70^{\circ}\text{C}$ . El ARN se cuantificó por espectrofotometría, visualizándose su integridad en geles de agarosa-formaldehído. El ADN cromosomal remanente se eliminó incubando la solución con DNasaI por 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ .

La síntesis de cADN se realizó en un volumen final de 40  $\mu\text{L}$  conteniendo ARN total, oligo-dT, dNTPs, DTT y ARNsIn. La reacción se incubó a  $42^{\circ}\text{C}$  por 2 min, se adicionó 1  $\mu\text{L}$  (200 U) de SuperScript II RNase H<sup>-</sup> reversa transcriptasa (Invitrogen), continuándose la incubación a  $42^{\circ}\text{C}$  por 50 min adicionales. La transcriptasa reversa se reemplazó por 1  $\mu\text{L}$  agua desionizada en el tratamiento control sin transcripción reversa. La reacción se inactivó a  $70^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Los oligo-dTs utilizados para la síntesis de cADN se marcaron radiactivamente con  $\gamma^{32}\text{P}$  ATP y T4 polinucleotido kinasa (Invitrogen). Los tubos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min, deteniéndose la reacción a  $68^{\circ}\text{C}$  por 10 min.

Los productos de la transcripción reversa se amplificaron por PCR en un termociclador GeneAmp PCR system 9700. Los productos PCR se resolvieron en geles de secuenciación compuestos por 8 M urea y 6% acrilamida. Finalizada la electroforesis, el gel se expuso húmedo a un film de autoradiografía a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Una vez revelada, la autoradiografía se alineó con el gel, cortándose las bandas de interés a través del film, y almacenándolas en tubos de microcentrifuga a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **1.3.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas durante el desarrollo de esta actividad

### **1.3.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Con el propósito de evitar eventuales efectos ambientales en la expresión de ARNm inducidos por el estrés, el "differential display" se realizó con ARN obtenido desde plantas cosechadas en siembras de otoño y primavera, en muestreos realizados sólo a las 72 h de agregado 0,1 mM P. Esta modificación reemplazó al muestreo inicialmente programado a las 24 y 72 h de agregado el P, y que consideraba ARN extraído de sólo una fecha de siembra.

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

### **1.4.1. Descripción de la metodología utilizada**

Mediante PCR se reamplificaron 104 productos de un total de 109 aislados utilizando "differential display". Los trozos de gel conteniendo el cADN de productos diferenciales (Actividad 1.3.) se descongelaron y se incubaron en 100 µL de H<sub>2</sub>O estéril. El ADN se eluyó a 100°C por 10 min, centrifugando el homogenizado por 2 min. El ADN se recuperó del sobrenadante y se precipitó con acetato de sodio, glicógeno y etanol absoluto. Los tubos se incubaron a -20°C por 30 min y se centrifugaron por 15 min. El pellet se lavó con 75% etanol, recuperando el ADN posterior a una centrifugación por 5 min. Finalmente, el pellet se secó a temperatura ambiente y resuspendió en 20 µL H<sub>2</sub>O estéril. Ocho µL de la suspensión conteniendo cADN eluido desde geles de acrilamida se reamplificó por PCR. Los productos de la reamplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1,5%. Confirmada la amplificación de productos del tamaño esperado, se recuperó la banda de interés, purificándose el ADN desde agarosa.

### **1.4.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas durante el desarrollo de esta actividad.

### **1.4.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Esta actividad se desarrolló de acuerdo al protocolo previamente establecido, sin modificaciones.

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

### **1.5.1. Descripción de la metodología utilizada**

Para cada fragmento diferencial, el ADN reamplificado y purificado en la actividad anterior se ligó al vector pGEM-T y se clonó en células competentes de *E. coli* JM109. Las reacciones de ligación se hicieron a 25°C por 1 h. La transformación se realizó mediante shock térmico. Las células transformadas se recuperaron en SOC y se incubaron a 37°C por 1,5 h. Ciento cincuenta µL de la suspensión bacteriana se cultivó en placas de Petri conteniendo medio Luria-Bertani (LB), ampicilina, IPTG y X-gal, por 16 h a 37°C. La colonias de bacterias transformadas se identificaron en función al fenotipo, seleccionándose entre 5 a 8 colonias por producto diferencial. Estas colonias se repicaron a placas de Petri conteniendo medio LB y ampicilina, se incubaron a 37°C por 16 h, y finalmente se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Tres clones de cada producto diferencial se repicaron a tubos Falcon conteniendo 4 mL de medio LB con el antibiótico de selección. Transcurridas 16 h de incubación a 37°C, el cultivo bacteriano se concentró por centrifugación, aislándose el ADN plasmidial. El ADN plasmidial de cada uno de los seis clones por fragmento diferencial se digirió con la enzima *Hind*III, con el propósito de verificar la presencia del fragmento clonado.

### **1.5.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas durante el desarrollo de esta actividad.

### **1.5.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Esta actividad se desarrolló de acuerdo al protocolo previamente establecido, sin modificaciones.

## **ACTIVIDAD 1.6. Secuenciación y análisis de homología**

### **1.6.1. Descripción de la metodología utilizada**

Alrededor de 300 ng de plasmidio conteniendo el inserto de interés se secuenciaron automáticamente en las instalaciones de INIA Carillanca. Se utilizaron los partidores universales M13R y M13F, analizando los productos de la reacción de secuenciación en un equipo ABRI PRISM 310 Genetic Analyser. Las secuencias obtenidas se compararon con aquellas depositadas en el banco de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el algoritmo BLAST. La homología se analizó en función a la secuencia nucleotídica de cada clon, así como a su secuencia aminoacídica deducida. Se utilizaron valores de "E" (probabilidad) menores a  $10^{-10}$  y  $10^{-7}$  como criterio para definir homología a nivel nucleotídico y aminoacídico, respectivamente.

### **1.6.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas durante el desarrollo de esta actividad.

### **1.6.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Esta actividad se desarrolló de acuerdo al protocolo previamente establecido, sin modificaciones.

## **ACTIVIDAD 1.7. Verificación de expresión diferencial mediante "northern blot"**

### **1.7.1. Descripción de la metodología utilizada**

En esta actividad se verificó la expresión diferencial mediante "northern blot" de los productos cADNs clonados en la Actividad 1.5. Se utilizó ARN obtenido desde raicillas proteoideas de *L. albus* muestreadas a las 0, 8, 24 y 72 h después de agregar 0,1 mM P a plantas mantenidas en ausencia de P por 20 días. Quince µg ARN total se denaturaron a 65°C por 5 min, realizándose la electroforesis en geles de agarosa-formaldehído. El ARN se transfirió a membranas de nylon GeneScreen Plus (NEN Life Science Products) por 24 h en 10X SSC. Finalizada la transferencia, la membrana se lavó en 2X SSC para remover agarosa residual. La transferencia del ARN se verificó exponiendo tanto el gel como la membrana a un transiluminador. El ARN se fijó e inmovilizó mediante exposición a un UV crosslinker (Hoefer) a 254 nm por 5 min, y posterior horneado a 80°C por 30 min. El cADN sonda se marcó radiactivamente con  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP mediante el kit Prime-a-gene labelling system (Promega), realizándose la hibridación la hibridación del tipo "northern blot" entre la sonda radiactiva y el ARN total transferido a la membrana de nylon. Finalmente, la membrana se expuso a autoradiografía en un film Biomax MR (Kodak) a -70°C.

### **1.7.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas durante el desarrollo de esta actividad

### **1.7.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Esta actividad se desarrolló de acuerdo a los protocolos previamente establecido, sin modificaciones.

## **ACTIVIDAD 1.8. Construcción de una genoteca de cADN de *L. albus***

### **1.8.1. Descripción de la metodología utilizada**

El ARN mensajero se obtuvo a partir del ARN total preparado en la Actividad 1.2., utilizando el protocolo "PolyATtrack<sup>®</sup> mRNA Isolation System III" (Promega). Para la síntesis del cADN se utilizó el protocolo "SuperScript<sup>™</sup> Lambda System for cDNA Synthesis and  $\lambda$  Cloning" (Gibco BRL). Para determinar la distribución de cADNs sintetizados, una fracción del cADN se analizó mediante electroforesis en 1% de agarosa. Veinte ng del cADN se ligó al vector de expresión  $\lambda$ ZIPLOX<sup>™</sup>. Los productos de la ligación se empacaron en partículas virales utilizando el extracto "Packagene<sup>®</sup> Lambda DNA Packing System" (Promega). Para determinar la cantidad de fagos obtenido tanto en las reacciones de empaquetamiento como en la genoteca amplificada, la solución de fagos se mezcló con una suspensión de la cepa Y1090 de *E. coli*. Dicha mezcla se sembró en medio LB suplementado con el antibiótico de selección. Para determinar el porcentaje de fagos recombinantes, una porción de la solución de fagos se utilizó para infectar células de la cepa DH10B(ZIP) de *E. coli*. Esta cepa bacteriana transforma el ADN del bacteriofago en un plasmidio, de modo que se puede evaluar la presencia de insertos mediante determinación del fenotipo de la colonia. La genoteca se amplificó en *E. coli* a modo de obtener alrededor de 30.000 fagos en placas de Petri de 15 cm de diámetro. Tanto la genoteca primaria como la secundaria actualmente se mantienen a  $-70^{\circ}\text{C}$  en tampón de fagos conteniendo 7% de dimetilsulfoxido.

### **1.8.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas durante el desarrollo de esta actividad.

### **1.8.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Inicialmente se obtuvo un título de genoteca primaria bajo ( $4 \times 10^4$  ufp/ml), requiriéndose por lo menos un orden de magnitud mayor. Para incrementar la cantidad de fagos en la genoteca primaria, se procedió a realizar ligaciones por períodos más extensas (16 h a 3 días) y a diversas temperaturas (4 y  $16^{\circ}\text{C}$ ), de modo de obtener un mayor número de moléculas de cADN ligadas en el vector.

## **ACTIVIDAD 1.9. Aislar el cADN que codifica para PEPC**

### **1.9.1. Descripción de la metodología utilizada**

Se realizaron los escrutinios dirigidos a aislar el cADN correspondiente al gen de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), a partir de una genoteca de cADN contruida desde raíces proteoideas de *L. albus* deficiente en P. El escrutinio de la genoteca se realizó en una alícuota de la suspensión de fagos que constituyen la genoteca amplificada, la que se diluyó y utilizó para infectar células de la cepa Y1090(ZL) de *E. coli*. Las placas de lisis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, sobre las cuales se realizó la hibridización. Los fagos que dieron reacción positiva se aislaron para realizar con ellos el segundo escrutinio. Los clones obtenidos se transformaron a la forma plasmidial mediante excisión *in vivo*. Para esto, cada fago seleccionado se utilizó para infectar la cepa DH10B (ZIP) de *E. coli*, obteniéndose colonias que portan el plasmidio pZL1 con el cADN de interés. El plasmidio se purificó, se aisló el inserto y se digirió con la enzima *Hind*III. Una fracción de la digestión se analizó en geles de agarosa al 1% para verificar la liberación de fragmento. Los insertos de interés se amplificaron por PCR, se secuenciaron utilizando los partidores universales M13R y M13F, y se les asignó identidad probable. Las secuencias de ADN se tradujeron a proteínas utilizando el servidor ExpASy, buscando secuencias aminoácidas que fueran similares a las descritas para PEPC.

Para aislar el cADN de largo completo de las PEPC se utilizó el kit GeneRacer (Invitrogen). El ARN total se defosforiló, se removió la estructura CAP y se sometió a transcripción reversa. Con el propósito de amplificar el extremo 5' de los cADNs de interés, se hizo PCR utilizando una polimerasa termoestable de alta fidelidad. La amplificación inicial involucró el partidor GR5' y un partidor específico diseñado sobre la base de las secuencias hasta ahora conocidas para las PEPCs de interés. Las reacciones de

amplificación se sometieron a electroforesis en agarosa, y se aislaron y clonaron en el vector pCR4-TOPO. El vector con el inserto se utilizó para transformar células químicamente competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las bacterias transformadas se seleccionaron en medio LB. Se aislaron los plasmidios y se amplificó el inserto de interés. Los productos de amplificación se analizaron electroforéticamente en geles de agarosa. Alrededor de 300 ng de ADN plasmidial se secuenciaron utilizando los partidores universales M13R y M13F.

Para asignar la identidad de los clones, se estableció su similaridad con genes conocidos, particularmente otras PEPCs. Con este propósito, las secuencias se sometieron a una comparación con aquellas depositadas en el banco de datos NCBI utilizando el programa BLAST. La similaridad de las secuencias obtenidas de los clones, tanto entre ellos como con la secuencia de otras PEPC, se realizó mediante alineamientos utilizando el programa MegAlign (ADNStar) y el programa MultAlign. Las secuencias de ADN se tradujeron a proteínas utilizando el servidor Expasy (Expert Protein Analysis System) del SIB (Swiss Institute of Bioinformatics). Los péptidos obtenidos se analizaron visualmente buscando secuencias aminoácidas que fueran similares a las descritas para PEPC.

### 1.9.2. Principales problemas metodológicos

No hubo problemas durante el desarrollo de esta actividad.

### 1.9.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas

Con el propósito de intentar discriminar la expresión de cada uno de los isogenes PEPC que finalmente se aislaron desde la genoteca de expresión, en esta actividad se incorporaron experimentos adicionales que correspondieron a estudios de expresión mediante "northern blot" y RT-PCR, cuya metodología se detalla a continuación.

#### 1.9.3.1. Estudios de expresión de transcritos mediante "northern blot"

Los estudios de expresión se realizaron con ARN extraído desde raicillas proteideas muestreadas a las 24 y 72 h de agregado 0,1 mM P a plantas mantenidas en ausencia de P por 24 días. Quince  $\mu$ g ARN total se denaturaron a 65°C por 5 min, realizándose la electroforesis en geles de agarosa-formaldehído. El ARN se transfirió a membranas de nylon GeneScreen Plus (NEN Life Science Products) por 24 h en 10X SSC. Finalizada la transferencia, la membrana se lavó en 2X SSC para remover agarosa residual. La transferencia del ARN se verificó exponiendo tanto el gel como la membrana a un transiluminador. El ARN se fijó e inmovilizó mediante exposición a un UV crosslinker (Hoefer) a 254 nm por 5 min, y posterior horneado a 80°C por 30 min.

Las sondas disponibles para PEPC36, PEPC41 y PEPC54 se marcaron radiactivamente con  $\alpha^{32}$ [P]-dCTP mediante el kit de partidores al azar (Promega). La membrana de nylon se hidrató en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> por 2 min y se incubó en la solución de prehibridación (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [pH 7,2], SDS, EDTA [pH 8,0], BSA) a 65°C por 2 h. Transcurrido este período, se agregó la sonda cADN radiactiva, continuándose la incubación en esta misma solución. Finalizada la hibridación, la membrana se lavó 2 veces a 65°C por 15 min a baja severidad, seguido de 2 lavados por 15 min a 65°C con solución de alta severidad. Finalmente, la membrana se expuso a autoradiografía en un film Biomax MR (Kodak) a -70°C, por tiempos variables dependiendo de la señal emitida por la sonda, y se regeneró en una solución SSC-SDS a 100°C por 10 min.

#### 1.9.3.2. Estudios de expresión de transcritos mediante RT-PCR

Para identificar expresión PEPC mediante RT-PCR, se diseñaron partidores que permitieran amplificar un fragmento de la región 3' UTR (región 3' no traducida) de cada uno de los 3 fragmentos ADN de PEPC disponibles. El ARN utilizado en estos experimentos se obtuvo de raicillas proteideas deficientes y suficientes en fosfatos, muestreadas a las 72 h después de agregado 0,1 mM P a plantas deficientes en P por 24 días. Se eliminó el ADN cromosomal, se cuantificó y se visualizó su integridad. La transcripción reversa de los ARN mensajeros se realizó utilizando un oligo-dT<sub>20</sub> y ARN total, en un volumen final de 25  $\mu$ L conteniendo DTT, dNTPs, ARNsin y la enzima reversa transcriptasa (Invitrogen).

Para establecer las condiciones óptimas de amplificación por PCR para los tres isogenes, se analizó una combinación de tres temperaturas de unión (54, 58 y 62°C) y cinco tratamientos de número de ciclos de amplificación (24, 28, 32, 36 y 40). Como control positivo se utilizó el gen de las ciclofilinas, cuya expresión es independiente de la disponibilidad de fosfatos (Peñaloza et al., 2002). De acuerdo a los resultados, el número de ciclos de amplificación y la temperatura de unión se optimizaron a 28 y 54°C, respectivamente.

## **ACTIVIDAD 1.10. Aislar cADNs codificantes para otros genes de *L. albus***

### **1.10.1. Descripción de la metodología utilizada**

Tal como se propuso en el proyecto, se estuvo alerta a la literatura en cuanto a encontrar la descripción de genes de lupino que podrían contribuir a la consecución del objetivo del proyecto. Particularmente, se mantuvo una constante revisión de los bancos de datos de genes, encontrándose dos genes de interés: un transportador de alta afinidad de fosfato (LaPT1) y dos cADNs que codifican para la enzima malato dehidrogenasa (MDH1 y MDH2). El aislamiento de cADNs desde *L. albus* se realizó de acuerdo a metodologías convencionales de la biología molecular (Sambrook et al., 1989). Se utilizó la información de las bases de datos para diseñar partidores que permitieran amplificar los genes de interés, o los productos diferenciales identificados mediante "differential display" como sonda para el escrutinio de la biblioteca de expresión.

### **1.10.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas durante el desarrollo de esta actividad.

### **1.10.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Esta actividad se desarrolló de acuerdo a los protocolos previamente establecido, sin modificaciones.

## **OBJETIVO ESPECIFICO 2**

### **ACTIVIDAD 2.1.1. Amplificar el promotor de los genes AtPT1, AtPT2 y AP de *Arabidopsis thaliana***

#### **2.1.1.1. Descripción de la metodología utilizada**

Utilizando información de secuencias publicada en la literatura (Okumura et al., 1998; Haran et al., 2000) se diseñaron partidores para amplificar el promotor del gen que codifica para un transportador de fosfato de alta afinidad (AtPT1) y del gen que codifica para una fosfatasa ácida (AP ó PUP-1) de *A. thaliana*. Los partidores se diseñaron con un sitio *HindIII* en sus extremos para facilitar la purificación. Se extrajo ADN genómico desde hojas de *Arabidopsis* crecidas por 3 semanas en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas a 23°C. Este ADN se utilizó como templado para las reacciones de amplificación de los promotores de los genes AtPT1 y PUP-1. Durante el desarrollo del proyecto, esta actividad se complementó con la amplificación del promotor del transportador de fosfato de alta afinidad AtPT2 de *Arabidopsis*.

Para la amplificación de AtPT1 y AtPT2 se realizaron ensayos utilizando *Taq* polimerasa, variando las condiciones de los ciclos hasta obtener un producto único. Esta amplificación se complementó con el uso de una ADN polimerasa termoresistente con actividad 5'-3' exonucleasa, o correctora (Pfu), para disminuir la probabilidad de errores al amplificar la secuencia. La Pfu ADN polimerasa genera un producto

de extremos romos, lo que permite clonar los promotores en pBluescript, plásmido que posee secuencias de partidores universales haciendo posible su posterior secuenciación. Paralelamente, esta estrategia asegura que los fragmentos amplificados por PCR son cortados por las enzimas de restricción para las cuales se incorporaron secuencias de reconocimiento. Los sitios de restricción adicionados a los partidores se utilizaron para el posterior clonamiento en el vector binario pBI101.1. En este plásmido, los sitios de restricción escogidos se encuentran en un polylinker precedente al gen *gus*. Con esto, la secuencia promotora quedó en el mismo marco de lectura del gen *gus*, haciendo posible modular su expresión. La amplificación del promotor de PAP-1 se realizó con la enzima *Taq* polimerasa, que produce amplificados con extremos adenilados. Se realizó una ligación por 16 h a 4°C con el vector pGEM-T, utilizando el “rapid ligation buffer” (Promega).

#### 2.1.1.2. Principales problemas metodológicos

No hubo problemas metodológicos durante el desarrollo de esta actividad.

#### 2.1.1.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas

Adicional a AtPT1 y PAP-1, en esta actividad también se amplificó el promotor de fosfato de alta afinidad AtPT2 de *Arabidopsis*.

### ACTIVIDAD 2.1.2. Clonamiento y secuenciación de los promotores amplificados

#### 2.1.2.1. Descripción de la metodología utilizada

El amplificado del promotor de AtPT1 se insertó en el vector pBluescript digerido previamente con *EcoRV*, endonucleasa que produce extremos romos. El amplificado del promotor de AtPT2 se insertó en el vector pGEM-T, para luego escindirlo mediante enzimas de restricción, e insertarlo en el vector pBluescript. Una vez amplificados y aislados, los promotores se clonaron corriente arriba del gen *gus* procedente de pBI101.1, en el plásmido pAHC25. Este vector contiene el gen *bar*, que confiere resistencia al herbicida Basta, bajo el promotor *ubi* de maíz, el cual hace que su expresión sea constitutiva. pAHC25 fue el vector utilizado para transformar trigo. Con el propósito de secuenciar los promotores obtenidos mediante la amplificación por PCR, éstos se clonaron primeramente en el vector pGEM-T (Promega). Los productos resultantes fueron el plásmido pCN1 que posee inserto el promotor de AtPT2, y el plásmido pCN3 producto de la ligación entre pGEM-T y el promotor de PAP-1. Ambos promotores fueron posteriormente secuenciados tanto para determinar su identidad como para constatar la no introducción de mutaciones durante el clonamiento.

El promotor de PAP-1 se intentó liberarlo desde pGEM-T utilizando las enzimas *Sall* y *BamHI*, sin resultados positivos. Se idearon tres estrategias distintas para su clonamiento en el vector binario pBI101.3. La primera de ellas consistió en amplificar el fragmento con la ADN polimerasa *Synergy* (Genecraft) y los partidores específicos del promotor, desde pCN3, y posteriormente ligar el amplificado al vector pBI101.3 previamente cortado con la enzima de restricción *SmaI*. La segunda estrategia consistió en obtener un amplificado de igual forma que el anterior, para luego digerirlo con la enzima *Sall*. El producto obtenido de esa digestión se ligó a pBI101.3 previamente digerido con *Sall* y *SmaI*. Por último, se amplificó con la enzima *Synergy*, utilizando los partidores SP6 (de pGEM-T) y PAPR, lo que posteriormente se digirió con la enzima *Sall*. El producto de esta digestión finalmente se clonó en pBI101.3 previamente digerido con *Sall* y *SmaI*.

#### 2.1.2.2. Principales problemas metodológicos

El clonamiento de los promotores PAP-1 y AtPT2 originó problemas tanto con la amplificación de sus secuencias, como en el clonamiento. Las modificaciones incorporadas permitieron finalmente clonar ambos promotores.

### **2.1.2.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Adicional a AtPT1 y PAP-1, en esta actividad también se aisló el promotor del gen AtPT2 de *Arabidopsis*, inicialmente no considerado en el proyecto.

## **ACTIVIDAD 2.1.3. Construcción de fusiones entre los promotores AtPT1, AtPT2 y AP, y el gen reportero *gus***

### **2.1.3.1. Descripción de la metodología utilizada**

Para verificar la expresión del gen de interés, así como el lugar de expresión en los tejidos de trigo transformado, en esta actividad se construyeron fusiones entre el gen reportero *gus* y los promotores AtPT1 y AtPT2. Ambos promotores se liberaron desde pBluescript mediante una digestión *HindIII/BamHI*, ligándose posteriormente al vector binario pBI101.1 digerido previamente con las mismas endonucleasas. Las técnicas de biología molecular para estas actividades se realizaron según Sambrook et al.(1989). El promotor AtPT1 se purificó desde ADN plasmidial a partir de una colonia positiva para pCN1, liberándose de este plasmidio mediante una digestión doble con las enzimas *Sall* y *SmaI*, para posteriormente insertarlo en el vector binario pBI101.3 previamente digerido con estas mismas enzimas de restricción. La misma estrategia se utilizó para el promotor AtPT2.

### **2.1.3.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas metodológicos durante el desarrollo de esta actividad.

### **2.1.3.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

De acuerdo a las modificaciones indicadas en el punto 2.1.2.3., se incorporó a esta actividad la construcción con el promotor AtPT2 fusionado a *gus*, además de AtPT1-*gus*. Evidencia reciente indica que PAP-1 se expresa en diferentes tejidos de la planta, incluida la parte aérea. Esta información sugiere que este promotor no sería raíz-específico, por lo que los trabajos con promotores de *Arabidopsis* continuaron sólo con AtPT1 y AtPT2.

## **ACTIVIDAD 2.2. Aislar el promotor de los genes TaPT1 y TaPT2 de trigo**

### **2.2.1. Descripción de la metodología utilizada**

Los factores de transcripción que modulan la expresión de genes difieren entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, lo cual sugirió la necesidad de identificar promotores específicos de trigo. Se ha descrito un transportador de P de alta afinidad en trigo (TaPT1, AF110180 NCBI), cuya regulación aún no se ha estudiado. Recientemente se describió la secuencia de otro transportador de P en trigo (TaPT2, AJ344240), del cual tampoco se conoce su regulación. De acuerdo a esta información, y adicional a TaPT1, en esta actividad también se aisló el promotor del gen TaPT2 de trigo.

Basado en la secuencia TaPT1 y TaPT2 disponible en la base de datos del NCBI, se diseñaron partidores específicos dirigidos a amplificar y clonar la región codificante de TaPT1 y TaPT2 de trigo (Actividad 2.2.1 en la sección Resultados). La amplificación se realizó mediante PCR hasta obtener una banda única. La banda se aisló desde geles de agarosa, se clonó en el vector pGEM-T (Promega) y se secuenció parcialmente utilizando los partidores universales M13F y M13R.

La expresión TaPT1 y TaPT2 de trigo se analizó mediante "northern blot" (Actividad 2.2.2 en la sección Resultados). La sonda utilizada correspondió al amplificado de la región codificante de ambos genes obtenida en la Actividad 2.2.1 (0,32 kb para AtPT1 y de 0,55 kb para AtPT2). Se utilizó el gen de la Actina

como control de carga, cuya sonda se obtuvo mediante RT-PCR amplificando un fragmento de 0,6 kb con partidores específicos de *Arabidopsis*. El ARN total se obtuvo de plantas de trigo crecidas durante 12 días con 0,1 mM P. Transcurrido este período se transfirieron a un medio carente de P (Peñaloza *et al.*, 2002), obteniéndose ARN de raíz y hojas a los 5 y 7 días posterior a la transferencia. Los controles se mantuvieron en 0,1 mM P por todo el período. Veinticinco µg de ARN se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa-formaldehído y se transfirieron a una membrana de nylon. El filtro se hibridó toda la noche con sondas de ADN marcado con <sup>32</sup>P. Para discriminar adicionalmente la expresión de ambos genes, se realizaron experimentos de RT-PCR utilizando ARN obtenido de la Actividad 2.2.1.2. La generación de cADN se realizó utilizando la enzima RevertAid H<sup>-</sup> M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas), con partidores específicos diseñados de acuerdo a la secuencia de ambos genes.

Para aislar la región 5' de los putativos promotores de los genes TaPT1 y TaPT2 (Actividad 2.2.3. en la sección Resultados), se utilizó el kit "Universal Genome Walker" (Clontech), el cual permite construir librerías genómicas utilizando enzimas de restricción que generan extremos romos y, mediante reacciones de PCR sucesivas, amplificar una región desconocida adyacente a una conocida. Utilizando este kit" se construyen librerías genómicas partiendo con una digestión con enzimas que produzcan como resultado extremos romos. En este caso se utilizaron las enzimas de restricción *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* y *StuI* provistas por el fabricante, para digerir 2,5 µg de ADN genómico de trigo. También se utilizó, adicionalmente para TaPT2, la enzima *SspI* (Fermentas), al no obtenerse un amplificado de un tamaño superior a 1 kb con las enzimas provistas por el kit. Luego se realizó una ligación con un adaptador de 50 nucleótidos que tiene sitios de unión para partidores específicos y sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *MluI*, *SalI* y *SmaI*.

Para amplificar y clonar la región promotora de TaPT1 y TaPT2 (Actividad 2.2.4. en la sección Resultados) se realizó un primer PCR con un partidor adaptador específico (AP1) como partidor "forward", y un partidor gen específico como partidor "reverse" (GSP1). Un segundo PCR utilizando como templado una dilución de 20 veces del primer producto de PCR se realizó con partidores internos que corresponden a un segundo partidor adaptador específico (AP2) como partidor "forward", y un segundo partidor gen específico como partidor "reverse" (GSP2). Estas dos reacciones de amplificación permitieron obtener productos PCR de diferente tamaño dependiendo de la librería genómica utilizada. El clonamiento del amplificado se realizó en el vector pGEM-T (Promega), mediante una ligación de 16 h a 4°C. La obtención de ADN plasmidial a partir de colonias positivas permitió secuenciar la región promotora.

### **2.2.2. Principales problemas metodológicos**

Se realizaron intentos para aislar una región promotora de mayor extensión para TaPT2, generando librerías genómicas adicionales a las provistas en el kit. Los productos obtenidos no superaron en ningún caso los 0,55 kb.

### **2.2.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Al aislamiento, estudios de expresión y clonamiento de TaPT1, en esta actividad también se incorporó el promotor TaPT2, que finalmente se utilizó en los estudios de funcionalidad de promotores homólogos en trigo.

## **ACTIVIDAD 2.3. Construir fusión entre el promotor del gen TaPT2 y el gen reportero *gus***

### **2.3.1. Descripción de la metodología utilizada**

Puesto que los resultados indicaron una expresión raíz específica y modulada por la disponibilidad de fósforo sólo para TaPT2 (ver sección Resultados), el proyecto se continuó con solo este promotor aislado de trigo. La fusión entre la región promotora de TaPT2 y el gen reportero *gus* se realizó en el vector pBI101.1. Para trasladar la secuencia (0,55 Kb) del promotor TaPT2 a un vector binario río arriba del gen reportero *gus*, se subclonó un amplificado desde pLMB6 con el primer AP2 de "Genome Walker" y el

primer pLMB6R, para obtener el vector pLMB8. El fragmento se liberó desde este vector mediante digestión con las enzimas *SalI* y *BamHI*, y se insertó en el vector binario pBI101.1 previamente digerido con estas enzimas de restricción, dando como resultado el vector pLMB9. Este vector posee un gen que le confiere resistencia a kanamicina, y es viable para la transformación de trigo.

### **2.3.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas metodológicos en el desarrollo de esta actividad.

### **2.3.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

La construcción génica que finalmente se utilizó para transformar trigo fue modulada por el promotor AtPT2, en reemplazo de AtPT1. Esta modificación se realizó esencialmente en función a estudios de expresión que indicaron que sólo AtPT2 sería modulado por la deficiencia de fósforo en raíces de trigo.

## **OBJETIVO ESPECIFICO 3**

### **ACTIVIDAD 3.1. Optimizar condiciones de transformación en cultivares de trigo chileno**

#### **3.1.1. Descripción de la metodología utilizada**

La transformación se realizó a través de biobalística usando el dispositivo "PDS 1000/He microprojectible gun" (Bio-Rad). Una vez establecida la metodología en el genotipo modelo de transformación genética Bobwhite, se transformó un cultivar de trigo elite chileno de hábito primavera (Dalcahue-INIA) y un cultivar de tipo alternativo (Dollinco-INIA). La transformación genética se realizó en embriones inmaduros, los que se mantuvieron en un medio de deshidratación (osmótico) con el propósito de pre-acondicionar las células al bombardeo con partículas de oro. Para evaluar expresión transiente se usó el plásmido pAHC25, que contiene el gen *gus* (que codifica para la enzima B-glucuronidasa) y el gen *bar* (que confiere resistencia al herbicida Basta). Ambos genes están bajo el control del promotor ubiquitin (*Ubi*) de maíz. Los embriones bombardeados se trasladaron a un medio de inducción al día siguiente del bombardeo.

#### **3.1.2. Principales problemas metodológicos**

No se detectaron problemas metodológicos durante el desarrollo de esta actividad.

#### **3.1.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Esta actividad se está realizando de acuerdo a lo programado, exceptuando modificaciones introducidas respecto al protocolo utilizado en el CIMMYT, y que consideraron principalmente presión de ruptura y distancia entre el macro y micro carrier.

### **ACTIVIDAD 3.2. Evaluar expresión transiente con el gen *gus***

#### **3.2.1. Descripción de la metodología utilizada**

Para evaluar expresión transiente se usó el plásmido pAHC25, que contiene el gen *gus* (que codifica para la enzima B-glucuronidasa) y el gen *bar* (que confiere resistencia al herbicida Basta), ambos bajo el control del promotor *Ubi* de maíz y clonados en el sitio de restricción *HindIII*. El ADN plasmidial se

precipitó en partículas de oro de 0,6 µm. Diez µL de micropartículas (microcarriers) se depositaron en macrocarriers, realizando los bombardeos con discos de ruptura de 900 y 1100 psi, bajo condiciones de esterilidad en cámaras de flujo laminar. Los embriones bombardeados se trasladaron a un medio de inducción al día siguiente del bombardeo. Transcurridos 2-3 días, los embriones se sometieron a un análisis histoquímico para evaluar la expresión transiente del gen *gus* utilizando X-gluc como sustrato. Las células embrionarias se observaron visualmente bajo lupa estereoscópica en función a la presencia de tinción azul, correspondiente al producto de la reacción enzimática de la proteína B-glucoronidasa, y que demuestra la expresión del gen *gus* en células transformadas.

### **3.2.2. Principales problemas metodológicos enfrentados**

No se detectaron problemas durante el desarrollo de esta actividad.

### **3.2.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Esta actividad se realizó de acuerdo a las metodologías inicialmente establecidas.

## **OBJETIVO ESPECIFICO 4**

### **ACTIVIDAD 4.1. Transformar trigo con el gen *gus*, *bar*, y nuevos promotores**

#### **4.1.1. Descripción de la metodología utilizada**

La transformación se realizó a través de biobalística utilizando embriones de trigo inmaduros obtenidos del cv. Bobwhite, en un sistema de co-transformación con dos plasmidios. Una construcción correspondió al plasmidio pAL51 que contiene el gen *bar* bajo el control del promotor constitutivo Ubiquitin (*Ubi*) de maíz, cuya expresión permite utilizar al herbicida Basta tanto como agente de selección tanto a nivel de cultivo *in vitro*, como en la evaluación fenotípica de la segregación del gen en invernadero. Las otras construcciones utilizadas correspondieron a los plasmidios pLMB2, pCN2 y LMB9, las cuales contienen el gen reportero *gus* bajo el control del promotor AtPT1, AtPT2 y TaPT2, respectivamente (Figura 1).

Paralelamente, en esta actividad se incorporó la construcción Actin-*gus* debido a que este promotor constitutivo ha mostrado en otros experimentos mayor actividad radical que el promotor *Ubi*. Para la expresión constitutiva con Actina se utilizó el plasmidio pACT-*gus* obtenido del Dr. Alessandro Peregrineschi (CIMMYT, México), que contiene el promotor de Actina de arroz fusionado al gen reportero *gus*.

#### **4.1.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas metodológicos durante el desarrollo de esta actividad.

#### **4.1.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Con el objetivo de disponer de al menos un promotor constitutivo funcional en trigo, en esta actividad se incorporó el promotor constitutivo Actin fusionado a *gus* (Actin-*gus*), como complemento a la construcción *Ubi-gus*.

## **ACTIVIDAD 4.2. Obtención de líneas transgénicas T<sub>0</sub>**

### **4.2.1. Descripción de la metodología utilizada**

Las líneas transgénicas T<sub>0</sub> se obtuvieron posterior al proceso de selección *in vitro* bajo el agente de selección Glufosinato, ingrediente activo del herbicida Basta. Las plántulas sobrevivientes en este medio *in vitro* se transplantaron a suelo texturizado en invernadero, y se clasificaron con una sinonimia tal que permitiera determinar con exactitud el origen de cada línea transgénica (embrión, célula, evento de transformación, presión de bombardeo, etc.). Al estado de tres hojas verdaderas, las plantas se clasificaron de acuerdo al nivel de expresión del gen *bar* en base a la resistencia al herbicida Basta. Para la obtención de líneas T<sub>0</sub> con el gen reportero *gus* bajo un promotor constitutivo, se utilizó el plasmidio pAHC25, el cual posee los genes *bar* y *gus* bajo el control del promotor *Ubi* de maíz. También se obtuvo líneas T<sub>0</sub> con el reportero *gus* fusionado al promotor Actin

### **4.2.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas metodológicos durante el desarrollo de esta actividad.

### **4.2.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Esta actividad se realizó de acuerdo a las metodologías inicialmente establecidas.

## **ACTIVIDAD 4.3. Análisis genético y molecular de plantas T<sub>0</sub>**

### **4.3.1. Descripción de la metodología utilizada**

El análisis genético consistió en test de progenie de líneas T<sub>1</sub> obtenidas a través de autofecundación de líneas transgénicas T<sub>0</sub>. Con este propósito, semillas T<sub>1</sub> obtenidas de líneas T<sub>0</sub> se recolectaron transcurridos 20 días post-antesis, se esterilizaron y extrajeron los embriones bajo estereo-microscopio. Las semillas recolectadas se germinaron en cápsulas de Petri y luego se transplantaron a suelo texturizado para el análisis de segregación genética del transgen. Para el caso de líneas transgénicas con el promotor AtPT1, AtPT2 y TaPT2, posterior al cultivo *in vitro* de embriones las plántulas se transplantaron a un sistema hidropónico con solución nutritiva para su aclimatación, y luego a soluciones hidropónicas deficientes en P. Las líneas transgénicas con los promotores constitutivos se cultivaron en solución nutritiva en presencia de P

El análisis molecular se realizó con ADN genómico total de cada una de las líneas transgénicas, extraído mediante el método de Chomczynski (Wincker). El ADN se cuantificó por espectrofotometría, utilizándose 50 a 70 ng de cada línea para amplificar el gen *bar* y los promotores AtPT1, AtPT2 y TaPT2 en las construcciones con promotores inducibles, así como el gen *bar* y los promotores Actina y *Ubi* en las construcciones con promotores constitutivos. Los productos de amplificación, cuyos tamaños se indican en la Figura 1, se separaron en geles de agarosa al 2%, y se visualizaron mediante tinción.

### **4.3.2. Principales problemas metodológicos**

No obstante numerosos intentos, no fue posible confirmar la presencia del transgen en plantas de trigo transformadas con los promotores constitutivos Actina y *ubi*. Sólo se obtuvo expresión en raíces.

### **4.3.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Uno de los problemas detectados en trigo es el alto grado de quimerismo en plantas T<sub>0</sub> en macetero. Esto generó un mayor trabajo, y más tiempo de lo planificado debido a que ha sido necesario analizar detalladamente al menos 4 espigas por planta. De esta forma se ha corroborado que una línea transgénica puede presentar espigas no transgénicas. En esta actividad, los análisis genético moleculares se extendieron hasta la generación T<sub>2</sub> (inicialmente no considerado en el proyecto).

## **ACTIVIDAD 4.4. Evaluar el nivel de expresión de los nuevos promotores en líneas T<sub>2</sub>**

### **4.4.1. Descripción de la metodología utilizada**

Inicialmente se planteó estudiar la expresión de promotores en líneas T<sub>0</sub>. Para evitar un posible efecto de dosis génica, descartar quimerismo y disponer de plantas homocigotas, los análisis de expresión se realizan finalmente en la generación T<sub>2</sub>. Esta modificación retrasó la actividad 4.4. en aproximadamente 10 meses, y explica en gran parte la necesidad de extender el período de ejecución de este proyecto.

En esta actividad se evaluó la funcionalidad de los promotores AtPT1, AtPT2 y TaPT2 fusionados al gen reportero *gus*. Los estudios consideraron: a) análisis histoquímico, b) expresión de transcritos *gus* mediante RT-PCR, y c) evaluaciones de actividad específica de la proteína Gus mediante fluorometría, en eventos RT-PCR positivos. Las líneas se cultivaron en hidroponía en soluciones nutritivas en presencia de P por 7 días. Una vez confirmado la homocigosis para el gen *bar*, diez de estas plantas se trasladaron a una solución de hidroponía sin fosfatos, desde donde se colectó periódicamente tejido radical para realizar los análisis de funcionalidad.

**Análisis histoquímico.** Las raíces de trigo transgénico se sometieron a tinción histoquímica para revelar actividad GUS utilizando la metodología de Jefferson et al. (1987). Brevemente, las raíces se incubaron en el sustrato de la enzima por 24 h a 37°C, se lavaron con etanol y se visualizó la tinción en raíces atribuible a la proteína Gus. Este mismo procedimiento se utilizó para plantas mantenidas en un suelo con 4 ppm de P, posterior al lavado de raíces para eliminar la tierra adherida.

**Expresión de transcritos *gus* mediante RT-PCR.** Se utilizaron muestras de raíces maceradas en nitrógeno líquido y almacenadas a -70°C. El ARN total se extrajo utilizando solución de Chomczynski con fenol (W&Z) y se cuantificó mediante espectrofotometría y visualización en geles denaturantes. El ARN total se trató con DnasaI para eliminar el ADN cromosomal, realizándose la transcripción reversa con 1 µg de ARN total libre de ADN. Los productos de la transcripción reversa se utilizaron como templado para la reacción de PCR en presencia de partidores específicos para amplificar un fragmento de 380 pb de transcritos *gus*, y para amplificar un fragmento de 250 bp de transcritos del gen ribosomal 28S de trigo (control interno). Se utilizaron 38 ciclos de amplificación. Los productos PCR se resolvieron en genes de agarosa y se visualizaron mediante tinción.

**Actividad de la proteína GUS mediante fluorometría.** La proteína total se extrajo desde muestras de raíces almacenadas a -70°C utilizando tampón fosfato pH 6,8, DTT, EDTA y triton X-114, y se cuantificó mediante Bradford. La reacción se inició con la incorporación del extracto (20 µg de proteína) a tubos conteniendo 2 mM MUG (metil umberiferil glucorónido) en 480 µl de tampón de extracción. La reacción se incubó por 6 h a 37°C, período durante el cual se tomaron muestras de 100 µl a las 0, 2, 4 y 6 h posterior a la adición del extracto, las que se traspasaron a tubos conteniendo 1,4 ml NaCO<sub>3</sub> para detener la reacción. El fluorómetro se calibró con concentraciones de metilumberiferona (MU) fluctuantes entre 0 y 1000 pmoles MU en 1,5 ml, antes del inicio de las mediciones de actividad. Para cada muestra, las unidades de fluorescencia se calcularon a partir de la recta de calibración, expresándose la actividad Gus como pmoles MU producidos min<sup>-1</sup>. La cuantificación de la proteína total permitió expresar los resultados de actividad Gus en el extracto como pmoles MU min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup> (actividad específica).

### **4.4.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas metodológicos durante el desarrollo de esta actividad.

### **4.4.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Las evaluaciones de expresión de los promotores se realizó en la generación T<sub>2</sub> y no en T<sub>0</sub> como estaba inicialmente programado. Esta modificación se introdujo con el propósito de realizar los análisis en líneas homocigotas para el transgen. Adicionalmente, los análisis histoquímicos se extendieron a plantas establecidas en un suelo muy bajo en P disponible (4 ppm). Esta adaptación le otorga particular interés a los resultados ya que en la literatura no existe información sobre tinción histoquímica Gus en plantas establecidas en este sustrato.

## **OBJETIVO ESPECIFICO 5**

### **ACTIVIDAD 5.1. Caracterizar metabolitos y actividad PEPC en cultivares de trigo no transformado**

#### **5.1.1. Descripción de la metodología utilizada**

Se cuantificaron exudados radicales, metabolitos (citrato, malato y fosfoenolpiruvato) y se evaluó actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) de raíces, en cinco cultivares de trigo mantenidos en ausencia y en presencia de 0,2 mM de P, utilizando *L. albus* como especie de referencia. Las plantas de trigo se transplantaron a ocho contenedores de 42 L conteniendo solución nutritiva basal en ausencia de P (4 contenedores), y en presencia de 0,2 mM P (4 contenedores).

Los exudados radicales se colectaron desde plántulas muestreadas a los 2, 9 y 16 días después del trasplante a la solución nutritiva. Dos ml de exudados se esterilizó por filtración, se concentró, y se resuspendió en 0,008 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Los exudados de citrato y malato se cuantificaron directamente por HPLC, utilizando estándares de ácidos orgánicos tratados de manera similar a las muestras. Una vez colectado los exudados, las raíces se molieron en nitrógeno líquido y almacenaron hasta su uso.

La actividad PEPC se evaluó en el tejido radical molido en nitrógeno líquido, extrayéndose las proteínas totales en tampón Hepes-KOH. La actividad PEPC se evaluó en una reacción acoplada a la enzima malato dehidrogenasa, a una longitud de onda de 340 nm. Las proteínas totales se cuantificaron por el método de Bradford, utilizando BSA como estándar.

Los metabolitos se evaluaron utilizando tejido radical molido en nitrógeno líquido. Las proteínas se precipitaron con 0,6 N ácido perclórico, cuantificando metabolitos en el sobrenadante posterior a su neutralización. El sobrenadante neutralizado se separó en tres fracciones, las que se utilizaron para cuantificar fosfoenolpiruvato mediante métodos enzimáticos, citrato y malato mediante HPLC, y fosfatos mediante métodos colorimétricos.

#### **5.1.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas metodológicos durante el desarrollo de esta actividad.

#### **5.1.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Aun cuando no se consideró inicialmente, se cuantificó la concentración de fósforo intracelular, con el objetivo de establecer el grado de estrés por deficiencia de P a que estuvieron sometidas las plantas.

### **ACTIVIDAD 5.2. Construir fusión entre promotor identificado y PEPC**

#### **5.2.1. Descripción de la metodología utilizada**

Se diseñaron construcciones basadas en un promotor constitutivo y un promotor inducible, a los cuales se fusionó PEPC. Para las construcciones de expresión constitutiva se utilizó el plasmidio pACT-*gus* obtenido del Dr. Alessandro Peregrineschi (CIMMYT, México), que contiene el promotor de Actina de arroz fusionado al gen reportero *gus*. Todas las amplificaciones utilizadas en esta actividad se realizaron utilizando la enzima *Taq* polimerasa HiFi (Invitrogen) para asegurar fidelidad, y se clonaron en el vector TOPO-TA. En las construcciones pAct-M1 y pAct-M2, que contienen el promotor de la Actina más un sitio de clonamiento múltiple (SCM), se introdujo un sitio *SpeI* en el extremo 3', el cual se utilizó para posteriormente introducir los respectivos promotores en el vector pBluescriptSK(+). Los vectores finalmente obtenidos, pVAN1 y pVAN2 conteniendo la región terminadora NosT, se evaluaron mediante la linealización con las enzimas de restricción involucradas en su SCM.

Para el diseño de las construcciones con el promotor constitutivo, la Actina se fusionó la región codificante del isogen PEPC36 generando la construcción Actina-PEPC36 inserta en el plasmidio pVAN1. Para la construcción con el promotor *Ubi*, el plasmidio pVAN1 se digirió con *NotI* y *BclI* para eliminar el fragmento de la Actina (2190 bp). Esta digestión generó dos productos, purificándose la banda de 6131 bp con sitios *NotI* y *BclI* en sus extremos. El promotor *Ubi* se liberó desde el plasmidio pAL51 con *NotI* y *BamHI* y se ligó al producto de la digestión anterior para generar la construcción *Ubi*-PEPC36.

La construcción PEPC36 modulada por un promotor regulado por fósforo se realizó con el promotor seleccionado en la Actividad 4.4. (AtPT2). Debido a la baja actividad Gus detectada con este promotor, y a la evidencia que indica que el nivel de expresión de transgenes en monocotiledóneas se puede incrementar significativamente con la introducción de intrones, se optó por incorporar en la construcción el primer intrón del gen *adh* de maíz (*adh1*) Este intrón se amplificó del ADN de maíz y se clonó en el vector TOPO-TA . El promotor del gen AtPT2 de *A. thaliana* se obtuvo de la construcción pCN2 que contiene dicho promotor fusionado al gen reportero *gus*. Para realizar esta construcción se utilizó como base el plasmidio pVAN-PEPC36, aprovechando los sitios *BclIII*, *EcoRI* y *NotI* para fusionar las regiones involucradas. Finalmente se obtuvo la construcción AtPT2-*adh*-PC36 (Figura 1).

### 5.2.2. Principales problemas metodológicos

Hubo dificultades técnicas en el ensamblaje de las construcciones, resueltas durante la ejecución del proyecto, pero que se tradujeron en atrasos significativos respecto de las fechas inicialmente propuestas.

### 5.2.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas

Inicialmente se consideró el diseño de tres construcciones: a) promotor inducible fusionado a PEPC, b) promotor constitutivo fusionado a PEPC y c) promotor constitutivo fusionado al gen de selección *bar*. Sin embargo, considerado los bajos niveles de expresión detectados con los promotores inducibles fusionados al gen reportero, así como evidencia aparecida durante la ejecución de este proyecto (Schunmann et al., 2004), se estimó imprescindible incorporar un intrón a la construcción con el promotor inducible al cual finalmente se fusionó PEPC.

Aun cuando inicialmente se consideró el promotor de la Actina para dirigir la expresión constitutiva, la imposibilidad de detectar expresión Actina en raíces de trigo sugirió la necesidad de incorporar una nueva construcción con el promotor *Ubi* para dirigir expresión constitutiva, en reemplazo de Actina. Esta modificación también se debe considerar en la extensión de los plazos inicialmente propuestos en este proyecto.

## ACTIVIDAD 5.3. Transformar trigos con el gen PEPC

### 5.3.1. Descripción de la metodología utilizada

Las construcciones con PEPC36 ligada a un promotor constitutivo (*Ubi*-PEPC36), al promotor modulado AtPT2 sin intrón (AtPT2-PEPC36), y fusionado al intrón *adh1* (AtPT2-*adh*-PEPC36) (Figura 1), se utilizaron para transformar trigo Bobwhite. Se utilizó un esquema de co-transformación con la construcción del gen de selección *bar* bajo la acción del promotor constitutivo *Ubi* de maíz. Las condiciones de transformación se presentaron en la metodología de la Actividad 4.1.

### 5.3.2. Principales problemas metodológicos

No se detectaron problemas durante el desarrollo de esta actividad.

### **5.3.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Debido al retraso en la construcciones génicas con el promotor modulado AtPT2 (Actividad 5.2.), se optó por priorizar las transformaciones con sólo una (PEPC36), entre los tres isogenes disponibles (PEPC36, PEPC41 y PEPC54). Esta modificación no alteró la meta comprometida en el proyecto, que inicialmente consideró transformar trigos con sólo un gen PEPC.

## **ACTIVIDAD 5.4. Obtener líneas transgénicas T<sub>0</sub> con el gen PEPC de *L. albus***

### **5.4.1. Descripción de la metodología utilizada**

Las líneas transgénicas T<sub>0</sub> se obtuvieron posterior al proceso de selección *in vitro* bajo el agente de selección Glufosinato. Las plántulas sobrevivientes en este medio se transplantaron a suelo texturizado en invernadero. Al estado de tres hojas verdaderas, las plantas se clasificaron de acuerdo al nivel de expresión del gen *bar* en base a la resistencia al herbicida Basta. Para la obtención de líneas T<sub>0</sub> con el gen reportero *gus* bajo un promotor constitutivo, se utilizó el plasmidio pAHC25, el cual posee los genes *bar* y *gus* bajo el control del promotor *Ubi* de maíz.

### **5.4.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas metodológicos durante el desarrollo de esta actividad.

### **5.4.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Esta actividad se realizó de acuerdo a las metodologías inicialmente establecidas.

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

### **5.5.1. Descripción de la metodología utilizada**

El desarrollo de las actividades anteriores permitió disponer de tres construcciones en las cuales se insertó la región codificante PEPC36, y que correspondieron al promotor constitutivo de la ubiquitina (*Ubi*-PEPC36), y al promotor inducible AtPT2 fusionado a PEPC36 sin intrón (AtPT2-PEPC36) y con intrón (AtPT2-adh-PEPC). Entre estas construcciones, sólo se presentan los análisis genético-moleculares de AtPT2-adh-PEPC36, abarcando desde la generación T<sub>0</sub> hasta la generación T<sub>2</sub>. En estos análisis se utilizaron partidores específicos que cubrieron tanto el segmento AtPT2-adh-PEPC36 (PCR1, 891 bp) como el segmento PEPC36-NosT (PCR2, 428 pb). El diseño de esta construcción, así como la posición de los partidores PCR1 y PCR2 se indican en la Figura 1.

### **5.5.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas durante el desarrollo de esta actividad.

### **5.5.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Esta actividad se desarrolló de acuerdo a los protocolos inicialmente establecidos.

## **ACTIVIDAD 5.6. Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T<sub>1-2</sub>**

### **5.6.1. Descripción de la metodología utilizada**

Esta actividad se realizó de manera similar a la actividad anterior, analizando genética y molecularmente las poblaciones T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>, con los mismos juegos de partidores descritos anteriormente. Estas poblaciones se obtuvieron mediante autopolinización, en condiciones de invernadero.

### **5.6.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas durante el desarrollo de esta actividad.

### **5.6.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Para complementar la información genética-molecular de los segregantes, en esta actividad también se agregó el análisis de la población T<sub>2</sub>.

## **ACTIVIDAD 5.7. Caracterización fisiológica de líneas transgénicas T<sub>2</sub>**

### **5.7.1. Descripción de la metodología utilizada**

Con el objetivo de realizar la caracterización fisiológica en plantas de trigo que efectivamente expresaran el transgen, esta actividad se complementó con estudios de expresión realizados mediante PCR en tiempo real (qPCR). Con este propósito, se evaluó la expresión PEPC y/o MDH en 20 plantas de la construcción AtPT2-adh-PEPC, 10 plantas de la construcción AtPT2-adh-MDH, y 10 plantas en donde se co-integraron ambos transgenes. La evaluación se realizó mediante PCR en tiempo real, posterior a la transcripción reversa a partir de ARNm. Las plantas se establecieron en solución nutritiva en presencia de 0,1 mM P por siete días, traspasándose luego a solución nutritiva en ausencia de P. El ARN se colectó desde raíces de plantas mantenidas por 14 días en ausencia de P, y se retrotranscribió a cADN mediante métodos convencionales. El PCR en tiempo real se realizó con 1 µl de cADN en un equipo Mx3000 (Stratagene). Para discriminar entre PEPC o MDH propias de trigo, uno de los partidores se diseñó con anclaje en la región NoST (Figura 1), de manera de atribuir la expresión exclusivamente al transgen. La expresión se cuantificó por el método delta-delta Ct, utilizándose el gen ribosomal 26S como control interno.

**Cuantificación de la actividad enzimática in vitro.** No fue posible realizar este experimento debido al retraso en la generación de plantas T<sub>2</sub>. Para cumplir con la meta final de este proyecto (disponer de plantas transgénicas que acumulen y exuden ácidos orgánicos) en el plazo estipulado y posterior a dos solicitudes de extensión, se optó por priorizar las evaluaciones sobre exudación y acumulación de citrato y malato, y la capacidad de plantas transgénicas para establecerse y crecer en suelos bajos en P disponible. Si bien no contribuye al logro de la meta final, la cuantificación de actividad PEPC se estima de relevancia para publicar los resultados de este proyecto.

**Exudación de citrato y malato.** Se realizaron estudios preliminares para determinar el período óptimo de muestreo para cuantificar ácidos orgánicos exudados. Semillas de trigo transgénico se germinaron y trasplantaron a solución nutritiva conteniendo 0,1 mM P. Transcurrida una semana las plantas se traspasaron a solución nutritiva sin P. Los exudados se colectaron a los 14 días posterior al traspaso desde +P a -P. La colecta de exudados se realizó en un volumen de 30 ml por 2 h. El extracto se liofilizó, se resuspendió en proporción 1:5 con 0,01 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> cuantificándose los ácidos orgánicos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los picos se compararon con estándares de concentración conocida tratados de manera similar a las muestras.

**Cuantificación de metabolitos.** Se cuantificó citrato y malato en el tejido radical de trigo transgénico utilizado en la exudación de citrato y malato. El tejido se colectó finalizada la exudación de cada planta individual cortando la raíz y dejando aproximadamente 3-4 cm de cuello de la planta. La planta con raíz parcial se traspasó a solución nutritiva para iniciar su recuperación, y a suelo texturizado transcurridos

una semana en recuperación. El tejido radical muestreado se almacenó inmediatamente a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su maceración en nitrógeno líquido. Los ácidos orgánicos se extrajeron con 0,6 N ácido perclórico, se neutralizaron con KOH, se filtraron a  $0,45\ \mu\text{m}$ , se liofilizaron y se resuspendieron en igual volumen de 0,01 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Los ácidos orgánicos se cuantificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de manera similar a los exudados radicales.

**Efecto de la expresión PEPC sobre la fotosíntesis.** Este experimento no contribuye mayormente a la meta final de este proyecto (disponer de plantas transgénicas que acumulen y exuden ácidos orgánicos), y tampoco es relevante para publicar los resultados generados. Se sugiere descartar este experimento, entre todos los realizados en este proyecto.

**Capacidad para utilizar fosfatos desde fuentes de P de baja solubilidad.** Con el propósito de evaluar la capacidad de trigo transformado para establecerse y crecer en presencia de fuentes de P de baja solubilidad, se realizaron ensayos preliminares con  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$  y  $\text{CaPO}_4$ , comparados con  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Previo a su utilización como fertilizante, se realizaron lavados sucesivos con agua destilada con el objetivo de eliminar el P soluble presente como contaminante, cuantificándose el P soluble posterior a cada lavado. Las evaluaciones se realizaron en vermiculita como sustrato, utilizando dosis de P equivalentes a 0 y  $40\ \text{mg kg}^{-1}$  de vermiculita humedecida. Adicionalmente, se realizaron ensayos preliminares para evaluar la capacidad de trigo de establecerse y crecer en suelos bajos en P disponible (4 ppm), utilizando dosis de P equivalentes a 0, 20, 40 y  $80\ \text{mg kg}^{-1}$  de suelo. Los sustratos se fertilizaron con solución nutritiva basal sin P (vermiculita) y con N, K, Mg, S y B de acuerdo al análisis preliminar (suelo). En ambos sustratos se sembró trigo Bobwhite, cosechándose la biomasa aérea a los 50 días posterior a la siembra. En estos ensayos se evaluó fitomasa aérea y concentración de Pi en la fitomasa aérea. De acuerdo a los resultados de crecimiento en ambos sustratos, la evaluación de plantas transgénicas se realizó finalmente en suelo con 4 ppm de P disponible, esterilizado para evitar interferencia de micorrizas.

**Capacidad para tolerar concentraciones de aluminio fitotóxico.** Este experimento aun no se realiza debido a que se requiere disponer de la información sobre exudación de ácidos orgánicos para discriminar entre las plantas transformadas. La alternativa de realizar este experimento en paralelo no fue factible debido al escaso número de semillas cosechadas de cada línea  $T_2$ , optando por priorizar la cuantificación de exudados radicales y la capacidad de plantas transgénicas para establecerse y crecer en suelos bajos en P disponible.

### 5.7.2. Principales problemas metodológicos

No hubo problemas metodológicos durante el desarrollo de esta actividad.

### 5.7.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas

Debido a la necesidad de disponer de líneas homocigotas, la caracterización fisiológica se realizó en líneas transgénicas de la generación  $T_2$ . Lo anterior provocó retrasos significativos en el desarrollo de esta actividad, los que se tradujeron en la imposibilidad de informar tanto el experimento relativo a la cuantificación de la actividad PEPC, como al comportamiento de plantas transgénicas en respuesta a aluminio fitotóxico. Debido al abundante número de plantas transgénicas  $T_2$ , se incorporó un experimento adicional que permitió seleccionar las plantas en función a su expresión de transcritos (qPCR).

## OBJETIVO ESPECÍFICO 6

### ACTIVIDAD 6.1. Construir fusión entre promotor identificado y otros genes de *L. albus*

#### 6.1.1. Descripción de la metodología utilizada

Esta actividad tuvo como objetivo introducir en trigo genes adicionales a PEPC, y cuya proteína contribuya a la síntesis y acumulación de ácidos orgánicos. Entre los genes potenciales identificados en este proyecto y que cumplen esta condición se optó por el gen que codifica a la enzima malato dehidrogenasa (MDH), aislada en la Actividad 1.10.

Se realizaron construcciones con el gen LaMDH1 (malato dehidrogenasa) aislado desde raíces proteoideas de *L. albus*, y fusionado a un promotor inducible por la deficiencia de fósforo. La racionalidad de esta elección se fundamenta en la posibilidad de canalizar el producto de la enzima PEPC (fosfoenolpiruvato) hacia la producción de malato, catalizado por la enzima malato dehidrogenasa (MDH). Los procedimientos que se utilizaron corresponden a aquellos que se indican para la Actividad 5.2. La diferencia entre ambas actividades radica en que, mientras en la Actividad 5.2 el gen fusionado a los promotores constitutivo e inducible corresponde a PEPC36, en la Actividad 6.1. el gen fusionado a los promotores constitutivo e inducible corresponde a LaMDH1. Como promotor regulado por la disponibilidad de fósforo se utilizó el promotor del gen AtPT2 de *A. thaliana*. En la actualidad se dispone de las construcciones AtPT2-MDH y AtPT2-adh-MDH (Figura 1), las que se utilizaron para transformar trigo.

#### 6.1.2. Principales problemas metodológicos

Los indicados en la Actividad 5.2

#### 6.1.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas

Debido a las dificultades que se han experimentado en esta Actividad, se optó por descartar el transportador de fosfato LaPT1 y priorizar construcciones sólo con el gen de MDH. La región codificante del gen MDH se expresó bajo la acción de promotor inducible AtPT2.

De acuerdo a los bajos niveles de actividad Gus detectada en plantas transformadas con el promotor inducible AtPT2, y a evidencia reciente que señala la utilidad de intrones para incrementar la expresión de este tipo de promotores en monocotiledóneas (Schunmann et al., 2004), la construcción AtPT2-MDH se complementó con la inserción del intron 1 del gen de la alcohol dehidrogenasa (AtPT2-adh1-MDH).

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

#### 6.2.1. Descripción de la metodología utilizada

Las construcciones con MDH ligada al promotor modulado sin intrón (AtPT2-MDH), y fusionado al intron *adh1* (AtPT2-adh-MDH) se utilizaron para transformar trigo Bobwhite, en un esquema de co-transformación con la construcción del gen de selección *bar* bajo la acción del promotor constitutivo *ubi* de maíz (*Ubi-bar*). Adicionalmente, en esta actividad se transformó trigo co-integrando ambas construcciones (AtPT2-adh-PEPC36 y AtPT2-adh-MDH) en el genoma de trigo Bobwhite. Se utilizó biobalística para la integración de genes de lupino en el genoma de trigo, de acuerdo a la metodología descrita en la Actividad 4.1

#### 6.2.2. Principales problemas metodológicos

Los indicados en la Actividad 5.2

### **6.2.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Debido al retraso en las construcciones con otros genes de *L. albus* (Actividad 6.1.), se optó por priorizar las transformaciones sólo con LaMDH, de los dos genes inicialmente considerados (LaMDH1 y LaPT1). Esta modificación alteró la meta comprometida en el proyecto (que inicialmente consideró transformar trigos con tres genes de *L. albus* adicionales a PEPC), para priorizar más bien cuatro construcciones génicas (AtPT2-PEPC36, AtPT2-adh-PEPC36, AtPT2-MDH y AtPT2-adh-MDH1).

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

### **6.3.1. Descripción de la metodología utilizada**

De manera similar a metodología indicada en las actividades 4.2. y 5.4., las líneas transgénicas T<sub>0</sub> se obtuvieron posterior al proceso de selección *in vitro*. Las plántulas sobrevivientes en este medio se transplantaron a suelo texturizado en invernadero. Al estado de tres hojas verdaderas, las plantas se clasificaron de acuerdo al nivel de expresión del gen *bar* en base a la resistencia al herbicida Basta. Para la obtención de líneas T<sub>0</sub> con el gen reportero *gus* bajo un promotor constitutivo, se utilizó el plasmidio pAHC25, el cual posee los genes *bar* y *gus* bajo el control del promotor *Ubi* de maíz.

### **6.3.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas metodológicos durante el desarrollo de esta actividad.

### **6.3.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Esta actividad se realizó de acuerdo a las metodologías inicialmente establecidas.

## **ACTIVIDAD 6.4. Caracterizar genética y molecularmente líneas transgénicas T<sub>0</sub>**

### **6.4.1. Descripción de la metodología utilizada**

El desarrollo de las actividades anteriores permitió disponer de dos construcciones en las cuales se insertó la región codificante MDH, y que correspondieron al promotor inducible AtPT2 fusionado a MDH sin intrón (AtPT2-MDH) y con intrón (AtPT2-adh-MDH). Entre estas construcciones, se presentan los análisis genético-moleculares de AtPT2-adh-MDH y de AtPT2-adh-MDH co-integrada a la construcción AtPT2-adh-PEPC36, abarcando desde la generación T<sub>0</sub> a la generación T<sub>2</sub>. Para discriminar el gen MDH endógeno, en estos análisis se utilizaron partidores específicos que cubrieron los segmentos AtPT2-adh-MDH (PCR3, 854 bp), MDH-NosT (PCR4, 428 pb), AtPT2-adh-PEPC36 (PCR1, 891 pb) y PEPC36-NosT (PCR1, 428 pb). El diseño de esta construcción, así como la posición de los partidores PCR1 y PCR2 se indican en la Figura 1.

### **6.4.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas durante el desarrollo de esta actividad.

### **6.4.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Esta actividad se desarrolló de acuerdo a los protocolos inicialmente establecidos.

## **ACTIVIDAD 6.5. Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T<sub>2</sub>**

### **6.5.1. Descripción de la metodología utilizada**

Esta actividad se realizó de manera similar a la actividad anterior, analizando genética y molecularmente las poblaciones T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>, con los mismos juegos de partidores descritos anteriormente. Estas poblaciones se obtuvieron mediante autopolinización, en condiciones de invernadero.

### **6.5.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas durante el desarrollo de esta actividad.

### **6.5.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Esta actividad se desarrolló de acuerdo a los protocolos inicialmente establecidos.

## **ACTIVIDAD 6.6. Caracterización fisiológica de líneas transgénicas T<sub>2</sub>**

### **6.6.1. Descripción de la metodología utilizada**

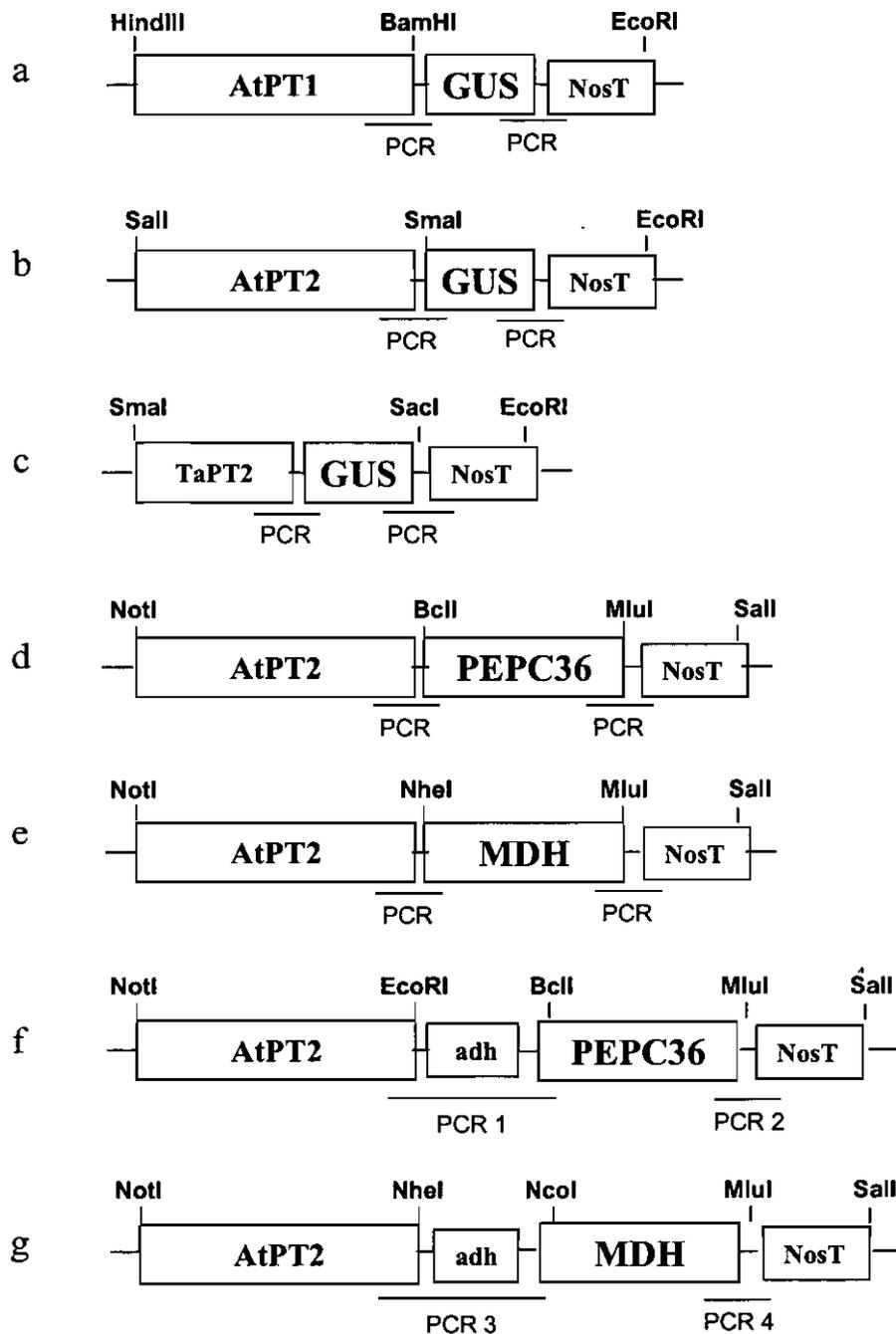
En esta actividad se caracterizó exudación de ácidos orgánicos a través de raíces concentración de ácidos orgánicos en raíces, y capacidad de plantas transgénicas de la generación T<sub>2</sub> para establecerse y crecer en suelos bajos en P disponible. Las plantas transgénicas evaluadas corresponden a las construcciones AtPT2-adh-MDH, así como AtPT2-adh-MDH co-integrada en el genoma Bobwhite junto a la construcción AtPT2-adh-PEPC36. Estas evaluaciones se realizaron en líneas transgénicas previamente analizadas por qPCR. Las metodologías utilizadas en estas evaluaciones se detalla en la Actividad 5.7

### **6.6.2. Principales problemas metodológicos**

No hubo problemas durante el desarrollo de esta actividad.

### **6.6.3. Adaptaciones o modificaciones introducidas**

Las indicadas en el punto 5.7.3.



**Figura 1.** Construcciones génicas con los promotores AtPT1 (a), AtPT2 (b) y TaPT2 (c) fusionados al gen reportero *gus*, y con el promotor AtPT2 fusionado a PEPC36 sin y con intrón (d y f) y a MDH sin y con intrón (e y g). Se indica el intrón *adh*, la región codificante de PEPC36 y MDH, el terminador *NosT*, los sitios de restricción y la posición de los partidores PCR. Todas las construcciones se insertaron en el vector *pBluescript*.

### 3. ACTIVIDADES DEL PROYECTO

En la siguiente hoja se presenta la carta Gantt de todas las actividades consideradas para la ejecución de este proyecto. En cuadros con fondo oscuro se indica la programación inicial. En cuadros con fondo claro se indica la reprogramación solicitada, en tanto que en cuadros con fondo blanco marcados con X (mayúscula) se señalan los tiempos reales utilizados hasta este Informe Final. Con x (minúscula) se marcan las extensiones solicitadas y no utilizadas efectivamente.

Entre 38 actividades cubiertas a través de seis Objetivos Específicos, no se realizó el mapeo físico del transgen (Actividad 5.8, Objetivo Específico 5) debido a la imposibilidad de disponer del equipo necesario (PCR in situ). La posibilidad de condicionar el desarrollo de esta actividad a la disponibilidad de este instrumento se indicó en la carta Gantt modificada que se envió a FIA el 31 de agosto de 2005. Si bien esta actividad no afecta el cumplimiento de los objetivos de este proyecto, se estima de relevancia para identificar la posición física del transgen, sobre todo en aquellas plantas en las cuales se ha co-integrado más de un gen.

Las discrepancias entre la programación inicial y final de actividades se explica principalmente por atrasos en la Actividad 1.9. (Aislar cADN de PEPC), así como por la necesidad de realizar las evaluaciones en plantas transgénicas de la generación  $T_2$ , en lugar de  $T_1$ .

La extensión en la Actividad 1.9 se atribuye al aislamiento y clonamiento del cADN de largo completo de tres isogenes PEPC en lugar de uno considerado inicialmente. Este trabajo generó información que permitió publicar un artículo científico en la revista *Journal of Experimental Botany*, así como incorporar la secuencia de los tres isogenes PEPC al GenBank. Adicionalmente, se estimó de relevancia para tratar de discriminar el isogen PEPC que se finalmente se utilizó para transformar trigo.

La extensión atribuible a la necesidad de realizar las evaluaciones en  $T_2$  se consideró como estrategia para disponer de plantas homocigotas para el transgen, y que se debió haber programado inicialmente. No obstante esta modificación y los esfuerzos dedicados, solo fue posible obtener homocigosis en aproximadamente el 20% de los eventos de transformación.

Durante el desarrollo de este proyecto se incorporaron experimentos adicionales a los inicialmente programados, estimados necesarios, y que contribuyeron con información relevante para la continuidad de esta línea de investigación. Entre muchos, especial relevancia adquiere el clonamiento de tres isogenes PEPC, la evaluación del gen reportero *gus* fusionado a promotores inducibles en plantas establecidas en suelo, así como la evaluación de la expresión de transgenes mediante PCR en tiempo real (qPCR). Sin embargo, también se debe mencionar tres experimentos inicialmente programados y no realizados, debido a la necesidad de priorizar resultados en función del objetivo central de este proyecto, y que se mencionan y discuten en la sección Resultados de este Informe Final.

A N O S

OBJETIVO/actividad	2002												2003												2004												2005												2006											
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
<b>OBJETIVO ESPECIFICO 1</b>																																																												
1.1. Diseño y construcción de patrones																																																												
1.2. Crecimiento de plantas y extracción de RNA																																																												
1.3. Experimentos "Differential Display"																																																												
1.4. Reamplificar los productos																																																												
1.5. Clonar productos diferenciales																																																												
1.6. Secuenciar y analizar homologías																																																												
1.7. Verificar expresión diferencial																																																												
1.8. Construir genoteca de cDNA																																																												
1.9. Aislar cDNA de PEPC																																																												
1.10. Aislar cDNA codificantes para otros genes de <i>L. albus</i>																																																												
<b>OBJETIVO ESPECIFICO 2</b>																																																												
2.1.1. Amplificar el promotor del gen APTI y AP de <i>L. thalictami</i>																																																												
2.1.2. Clonar y secuenciar los fragmentos obtenidos																																																												
2.1.3. Construir fusión entre los promotores aislados y el gen <i>gus</i>																																																												
2.2.1. Amplificar y clonar el gen TaPTI																																																												
2.2.2. Determinar la expresión de TaPTI																																																												
2.2.3. Aislar la región 5' del gen TaPTI																																																												
2.2.4. Amplificar y clonar la región promotora del gen TaPTI																																																												
2.2.5. Construir fusión del promotor identificado con <i>gus</i>																																																												
<b>OBJETIVO ESPECIFICO 3</b>																																																												
3.1. Optimizar condiciones de transformación en cultivos de trigo chileno																																																												
3.2. Evaluar expresión transiente del <i>gus</i>																																																												
<b>OBJETIVO ESPECIFICO 4</b>																																																												
4.1. Transformar trigo con el gen <i>gus</i> , <i>bar</i> y nuevos promotores																																																												
4.2. Obtener líneas transgénicas T0																																																												
4.3. Analizar genética y molecularmente transformantes T0																																																												
4.4. Evaluar nivel de expresión de los nuevos promotores en líneas T0																																																												
<b>OBJETIVO ESPECIFICO 5</b>																																																												
5.1. Caracterizar metabolitos y actividad PEPC en trigo no transformado																																																												
5.2. Construir fusión entre promotor identificado y PEPC																																																												
5.3. Transformar trigo elite con gen PEPC																																																												
5.4. Obtener líneas transgénicas T0																																																												
5.5. Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T0																																																												
5.6. Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T1																																																												
5.7. Caracterizar fisiológicamente líneas transgénicas T1																																																												
5.8. Mapear físicamente el transgene en línea elite T1																																																												
<b>OBJETIVO ESPECIFICO 6</b>																																																												
6.1. Construir fusiones entre promotor identificado y otros genes de <i>L. albus</i>																																																												
6.2. Transformar trigo con otros genes de <i>L. albus</i>																																																												
6.3. Obtener líneas transgénicas T0																																																												
6.4. Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T0																																																												
6.5. Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T1																																																												
6.6. Evaluar capacidad de plantas T1 para crecer en suelo con bajo P																																																												

## IV. RESULTADOS DEL PROYECTO

### OBJETIVO ESPECIFICO 1

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

Se diseñaron 24 partidores arbitrarios y tres partidores de anclaje (oligo-dTs) de 16 mers, conteniendo un sitio de restricción *HindIII* en el extremo 5' para facilitar la liberación del fragmento clonado. Los partidores se sintetizaron en Life Science Technology. Los tres oligo-dTs se diferenciaron entre sí por la incorporación de una base (A, G ó C) en el extremo 3'. Esta estrategia permitió separar los ARNm en tres sub-poblaciones, las cuales se combinaron con los 24 partidores arbitrarios para los análisis de expresión diferencial (Actividad 1.3)

*En esta actividad se construyeron 27 partidores para iniciar el aislamiento de genes desde raíces proteoideas de L. albus.*

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

En contraste a raíces proteoideas, el tejido radical donde ocurre la exudación de ácidos orgánicos en *L. albus* (raicillas proteoideas) es significativamente bajo en cantidad. Considerando esta limitación, la extracción de ARN se realizó desde aproximadamente 200 plantas de *L. albus* mantenido en solución nutritiva en ausencia de P. Se obtuvo un rendimiento de 619 µg de ARN total, con lo que se superó la meta (200 µg) en esta actividad. Este ARN total se utilizó para los experimentos de "differential display", y para la construcción de la genoteca de expresión desde donde se aislaron los cADNs de largo completo correspondientes a los genes que se introducirán en trigo.

*En esta actividad se aisló el ARN necesario para realizar los experimentos de differential display y la construcción de una genoteca de expresión, en cantidades superiores a la meta inicialmente propuesta.*

#### ACTIVIDAD 1.3. "Differential display" de ARN mensajeros

Se detectaron entre 80 a 90 bandas cADN expresadas con una determinada combinación de partidores. Considerando las 72 combinaciones posibles (3 partidores de anclaje y 24 partidores arbitrarios), el número total de transcritos visualizados correspondió aproximadamente a 6.000. En 109 de éstos se detectó expresión diferencial, indicando que los genes que se inducen o reprimen en respuesta a esta condición de estrés correspondería aproximadamente al 2%. Si se considera la redundancia (presencia repetida de un mismo gen) y eventuales falsos positivos, este porcentaje es una sobre-estimación de la proporción real de expresión diferencial de genes en el tejido utilizado como modelo.

*En esta actividad se identificaron 109 productos diferenciales, de un total de 100 comprometidos en el proyecto.*

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

Se reamplificaron 104 productos diferenciales de un total de 109 identificados y aislados mediante "differential display", lo que indica un 95% de recuperación de fragmentos. Del total de 104 productos reamplificados se seleccionaron 50 para pasar a la etapa de clonamiento, cuya discriminación se realizó en función a la intensidad de la banda y tamaño del fragmento.

*En esta actividad se reamplificaron 104 productos diferenciales, de un total de 80 comprometidos.*

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

Se clonaron 61 productos diferenciales aislándose entre cinco a ocho colonias independientes de cada uno de ellos. El ADN plasmidial de tres clones por producto diferencial se digirió con la enzima *HindIII* para verificar la presencia del inserto. La presencia del inserto se confirmó: a) en los tres clones de 40 productos diferenciales, b) en dos de los tres clones en 13 productos diferenciales, c) en uno de los tres clones en dos productos diferenciales, d) en ninguno de los tres clones en seis productos diferenciales. Con el propósito de disponer al menos de tres clones por producto diferencial, se prepararon nuevas colonias desde aquellos productos diferenciales donde sólo se obtuvo 1 ó 2 clones positivos. Se descartaron de los análisis posteriores aquellos productos diferenciales donde no se obtuvieron clones positivos en tres intentos.

*En esta actividad se clonaron 61 productos diferenciales, de un total de 50 comprometidos en el proyecto.*

#### **ACTIVIDAD 1.6. Secuenciación y análisis de homología**

Se realizó un total de 150 secuenciaciones entre los 61 productos diferenciales. Dependiendo del número de clones positivos y de la homología de bases entre ellos, se secuenciaron entre dos ó más clones dentro de un mismo producto diferencial. De acuerdo a la probable homología de secuencias con aquellas depositadas en el banco de datos del NCBI, se dispone de clones con homología a fosfatasas, a la enzima malato dehidrogenasa, a proteínas relacionadas con la madurez, a proteínas inducidas por elicitores, a acuaporina y a ubiquitinas, entre otras.

*En esta actividad se secuenciaron 61 productos diferenciales, de un total de 50 comprometidos.*

#### **ACTIVIDAD 1.7. Verificación de expresión diferencial**

Se realizaron 32 hibridaciones del tipo "northern", utilizando como sonda el cADN de clones independientes aislados mediante "differential display". Se verificó expresión diferencial en 28 de ellos, en tanto que sólo cuatro corresponderían a falsos positivos. El porcentaje de falsos positivos (12,5%) es consistente con estudios que hemos realizado anteriormente (Peñaloza et al., 2002), y significativamente inferior al que caracteriza a la técnica del "differential display". Veinte de estos cADNs reconocieron transcritos que se expresan preferentemente en ausencia de fosfatos, en tanto que ocho corresponderían a transcritos que se expresan en presencia de fosfatos. Ninguno de los cADNs identificados en este proyecto tiene homología con 17 cADNs identificados en estudios previos (Peñaloza et al., 2002).

*Se analizó la expresión diferencial de 32 cADNs, de un total de 30 comprometidos en el proyecto. Esto indica que actualmente se dispone de cADNs parciales correspondiente a más de 45 genes (o isogenes) que se expresan diferencialmente en raíces proteoideas de *L. albus*.*

### **ACTIVIDAD 1.8. Construcción de una genoteca de cADN de *L.albus***

El ARN total extraído en la Actividad 1.2. se utilizó para purificar el ARN mensajero (ARNm), del que se obtuvo 10 µg. Considerando que la abundancia del ARNm en la células es usualmente entre un 1 a 5%, la cantidad de ARNm obtenido corresponde al 1,6% del ARN total, valor que se encuentra dentro de lo esperado. La síntesis de cADN se realizó a partir de 5 µg de ARNm. El cADN se ligó en el vector λZIPLOX, y se empacó en partículas virales, determinándose un título de  $1 \times 10^5$  ufp/ml. Se dispone de una genoteca primaria de  $3,9 \times 10^5$  fagos totales en un volumen de 3 ml, con un título de  $1,3 \times 10^5$  ufp/ml, razonables para una genoteca primaria. El análisis del porcentaje de fagos recombinantes en cada una de las ligaciones efectuadas fluctuó entre 73% y 97% . La amplificación realizada resultó en una genoteca secundaria de 76 ml con un título de  $2,88 \times 10^{14}$  ufp/ml.

*En esta actividad se construyó una biblioteca de expresión desde raicillas proteoideas de *L. albus*, cumpliéndose la meta comprometida en el proyecto.*

### **ACTIVIDAD 1.9. Aislar el cADN que codifica para PEPC**

Puesto que trabajos preliminares (Peñaloza et al., 2002) habían permitido aislar dos cADN parciales correspondientes al extremo 3' del cADN de la PEPC, se sugirió que podrían existir más de una isoforma PEPC en raicillas proteoideas de *L. albus*. Consecuentemente, se decidió aislar todos los probables isogenes PEPC presentes en la genoteca. El escrutinio de la genoteca permitió identificar 50 clones PEPC putativos, de los cuales se seleccionó 13 para secuenciar. El análisis de secuencias indicó que éstas se agruparon en tres grandes categorías. La excepción correspondió a los clones 8, 2 y 45, cuyas secuencias fueron significativamente divergentes. El análisis de homología de secuencias indicó que los clones 8 y 2 no presentan homología con genes conocidos. En tanto, el clon 45 presentó similitud significativa con genes que codifican para la ascorbato peroxidasa, enzima involucrada en diversos tipos de estrés en plantas y otros organismos. Los otros 10 clones mostraron alta homología con la PEPC de plantas. Los clones 15c, 20, 37, y 54c tienen una secuencia muy similar a la del fragmento C4280 identificada previamente (Peñaloza et al., 2002), y que en este trabajo se denominó PEPC54. Los clones 10, 29 y 41 comparten una secuencia muy similar al del fragmento A4271 identificado previamente (Peñaloza et al., 2002), y forman el grupo denominado PEPC41. Los clones 14b, 31 y 36 son similares entre ellos y forman un grupo denominado PEPC36. Este último grupo de clones son bastante similares a una PEPC de *L. albus* (PEPC1), cuya secuencia fue publicada en la base de datos del NCBI en diciembre del 2001. Este cADN (accesión AF459644) no está asociado con ninguna publicación, por lo cual se desconoce su relevancia en la síntesis de ácidos orgánicos en raíces proteoideas de *L. albus*.

Para obtener los cADNs de largo completo de los tres isogenes PEPC se utilizó el sistema GeneRacer. Finalmente se obtuvo la región codificante de las tres PEPCs, cuyo tamaño varía en tres nucleótidos de largo, lo que se traduce en una proteína deducida que varía en un aminoácido (967 a 968 aminoácidos). De la secuencia aminoacídica de cada proteína se determinó ciertas características fisicoquímicas tales como el punto isoelectrico. De acuerdo a estas propiedades, PEPC54 sería más alcalina que PEPC41 y PEPC36, mientras que estas dos últimas se presentan más ácidas.

Con el propósito de discriminar la expresión de transcritos de los tres isogenes PEPC detectados en raicillas proteoideas de *L. albus*, se realizaron experimentos adicionales de "northern blot " y RT-PCR. Utilizando ARN extraído desde raicillas proteoideas y eje de un conglomerado de raicillas proteoideas, los análisis mediante "northern blot" no permitieron discriminar con precisión la expresión de isogenes PEPC en estos tejidos radicales. Es importante mencionar que, no obstante las diferencias nucleotídicas en la región 3' UTR, los tres isogenes comparten en común fragmentos de secuencia idénticos que podrían estar hibridando y originando una señal positiva.

Utilizando las condiciones de PCR estandarizadas para detectar tanto los tres isogenes como para el control interno (ciclofilinas), los estudios mediante RT-PCR permitieron identificar la presencia de transcritos que codifican para las tres isogenes PEPC en raíces totales, raíces primarias y hojas de *L.albus* muestreadas a las 72 h de agregado 0,1 mM P a plantas deficientes en P por 24 días. Sólo

PEPC36 se detectó también en cotiledones, sugiriendo que ésta correspondería a la isoforma PEPC "housekeeping" (ie. presente en todos los tejidos de la planta). La expresión del transcrito PEPC36 es similar a PEPC54 y, en contraste a PEPC41, ambos parecen no ser fuertemente modulado por la disponibilidad de P. Esta expresión es consistente con lo observado en experimentos independientes y realizados con ARN obtenido de ensayos diferentes, y sugieren que la expresión de los tres isogenes estarían modulado por distintos promotores PEPC, y que PEPC41 sería más fuertemente regulado por la disponibilidad de P (Peñaloza et al., 2005) Cualquiera sea la explicación fisiológica, la señal detectada en estudios de regulación, ya sea mediante "northern blot" o RT-PCR, son el reflejo de la expresión del promotor y, por lo tanto, no permiten discriminar la expresión de la proteína PEPC.

*En esta actividad se aisló el cADN de largo completo de tres isogenes PEPC que se expresan en raíces proteoideas de L. albus, de uno comprometido en el proyecto. Debido a la necesidad de discriminar entre estos isogenes, adicionalmente se realizaron estudios de expresión mediante "northern blot" y RT-PCR no considerados inicialmente.*

#### **ACTIVIDAD 1.10. Aislar cADNs codificantes para otros genes de L. albus**

Tal como se propuso en el proyecto, se estuvo alerta a la literatura en cuanto a encontrar la descripción de otros genes de *L. albus* que podrían estar asociados a la estrategia que se pretende incorporar en trigo transgénico. Además de los tres isogenes PEPC, finalmente se aisló el cADN de largo completo de un transportador de fosfatos de alta afinidad, una malato dehidrogenasa, una sulfolípido sintasa y una que codifica para la enzima ascorbato peroxidasa .

**Transportador de fosfato de alta afinidad.** La proteína que codifica al transportador de fosfatos de alta afinidad (LaPT1) podría aumentar la capacidad de las plantas para utilizar P soluble presente en baja concentración en la rizósfera. Basados en la secuencia disponible en la base de datos, se diseñaron partidores que permitieron amplificar una banda de alrededor de 1700 pb. La amplificación de los putativos clones para este transportador obtuvo una banda de alrededor de 2000 pb. El clonamiento y posterior secuenciación de esta banda confirmó la identidad de dicho cADN como LaPT1.

**Malato dehidrogenasa.** La enzima malato deshidrogenasa (MDH) participa en la síntesis de ácidos orgánicos, por lo que se espera que su sobre-expresión se traduzca en la preferencia hacia la producción de malato en el citosol, el que podría ser eventualmente exudado en la rizósfera. En el Genbank están descritas dos secuencias que codifican para MDH (MDH1 y MDH2), bastante similares entre sí. Basado en esta información, se diseñaron partidores que amplificaron una banda de alrededor de 1200 pb. El clonamiento y posterior secuenciación de esta banda confirmó que se trata del cADN de largo completo que codifica para MDH1.

**Sulfolípido sintasa.** Se hizo un escrutinio doble de la genoteca de cADN, utilizando como sonda un fragmento obtenidos mediante "diferencial display" que codificaría parcialmente para una sulfolípido sintasa que se expresa en ausencia de P. De este escrutinio doble se aislaron alrededor de 20 clones. La secuenciación y análisis de estos clones identificaron al clon E1c19 con homología con la sulfolípido sintasa de *A. thaliana*, del cual se dispone el cADN de largo completo. Esta enzima participa en el reciclaje de fósforo desde fosfolípidos de membrana, reemplazándolos por sulfolípidos.

**Ascorbato peroxidasa** Durante el escrutinio realizado a la genoteca de cADN para aislar los genes PEPC se obtuvieron como "contaminantes" tres clones que al secuenciarlos no correspondían a PEPC. El análisis de la secuencia parcial del extremo 3' de los tres clones permitió establecer que el clon E3c45 correspondería a una ascorbato peroxidasa. Genes de este tipo están ampliamente descritos en plantas participando en respuesta a diversos tipos de estrés. El clonamiento y posterior secuenciación de esta banda confirmó que se trata del cADN de largo completo que codifica para una ascorbato peroxidasa.

*En esta actividad se aisló el cADN de largo completo de cuatro genes que se expresan en raíces proteoideas de L. albus, de un total de tres comprometidos en el proyecto.*

## OBJETIVO ESPECIFICO 2

### ACTIVIDAD 2.1.1. Amplificar el promotor de los genes AtPT1 y AP de *Arabidopsis thaliana*

Utilizando partidores específicos diseñados de acuerdo a secuencias disponibles en la base de datos (GenBank), se amplificaron desde ADN genómico las secuencias correspondientes a los promotores del gen que codifica para un transportador de fosfato de alta afinidad (AtPT1) y del gen que codifica para una fosfatasa ácida (AP ó PAP-1), ambos de *Arabidopsis*. La amplificación se realizó con una polimerasa con actividad correctora, con el fin de minimizar la posibilidad de errores en la reacción de PCR. Los tamaños amplificados corresponden a 2,07 kb para AtPT1 y 1,5 kb para PAP-1. La identidad de estos cADNs se confirmó mediante análisis de restricción y secuenciación parcial.

Evidencia publicada durante la ejecución de este proyecto (Mudge et al., 2002) señala que los transportadores de fosfato de *Arabidopsis* (APT1 y AtPT2) son regulados negativamente en presencia de P. La diferencia entre ellos radica en que, mientras AtPT1 mantiene una expresión significativa bajo condiciones de suficiencia de P, AtPT2 se expresa sólo en ausencia de P. Esta evidencia indicaría que AtPT1 no sería fuertemente modulado por la disponibilidad de este nutriente. Por tal razón, y adicionalmente a AtPT1, se amplificó el promotor AtPT2 (3 kb). Análisis en genes de agarosa detectaron productos únicos para cada promotor, los que se insertaron en pGEM-T.

*En esta actividad se amplificaron tres promotores potenciales para dirigir la expresión de genes en trigo (AtPT1, AtPT2 y PAP-1), de un total de dos comprometidos en el proyecto.*

### ACTIVIDAD 2.1.2. Clonamiento y secuenciación de los promotores amplificados

Los fragmentos amplificados en la Actividad 2.1.1 se sub-clonaron en el vector pBluescript SK y se secuenciaron. Las secuencias obtenidas corresponden a secciones río arriba de los genes AtPT1 y AtPT2, según la base de datos NCBI, lo que confirma que el clonamiento de los promotores fue correcto. Debido a que los promotores de transportadores de fosfato de alta afinidad son más relevantes para dirigir la expresión de genes que las fosfatasas, y más específicos de raíces, el promotor PAP-1 se reemplazó por el promotor AtPT2. Este último promotor fue el que finalmente se utilizó para dirigir la expresión de genes en trigo.

*En esta actividad se clonaron y secuenciaron tres promotores potenciales para dirigir la expresión de genes en trigo (AtPT1, AtPT2 y PAP-1), cumpliendo con la meta comprometida en el proyecto.*

### ACTIVIDAD 2.1.3. Construcción de fusiones entre los promotores AtPT1 y AtPT2, y el gen reportero *gus*

El fragmento correspondiente a los promotores aislados en la Actividad 2.1.1 se liberó de pGEM-T con las enzimas *Sall* y *BamHI*, lo cual permitió insertarlo directamente en el vector binario pBI101.3, río arriba del gen reportero *gus*. Este sitio de clonamiento se comprobó mediante la utilización de enzimas de restricción para escindir y analizar el patrón de restricción del fragmento. Todos los cortes realizados presentan resultados que coinciden con lo esperado para el plásmido pCN2. Este vector será utilizado para la transformación de trigos. El diseño de las construcciones se indica en la Figura 1.

*En esta actividad se realizaron las construcciones con los promotores inducibles fusionados al gen reportero *gus* (AtPT1-*gus* y AtPT2-*gus*), que se utilizarán para estudios de funcionalidad de promotores. Estos resultados dan cumplimiento a lo comprometido en el proyecto.*

### **ACTIVIDAD 2.2.1. Amplificación y clonamiento del promotor del gen TaPT1 de trigo**

Utilizando partidores específicos, se amplificó y clonó un fragmento de 0,32 kb del transportador de fosfato de alta afinidad TaPT1. Adicionalmente, también se amplificó y clonó un fragmento de 0,55 kb del transportador de alta afinidad TaPT2. No obstante los intentos, no fue posible amplificar fragmentos superiores a los indicados. Evidencia reciente de estudios realizados con transportadores de fosfato de alta afinidad (Schunmann et al., 2004) indica que la funcionalidad de promotores de transportadores de fosfato está determinada esencialmente por las primeras 100 bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (ATG). Sobre la base de esta evidencia, ambos promotores serían funcionales en trigo.

*En esta actividad se amplificaron y clonaron fragmentos parciales de dos promotores de genes que codifican transportadores de fosfato de alta afinidad en trigo (TaPT1 y TaPT2), de uno (TaPT1) comprometido en este proyecto.*

### **ACTIVIDAD 2.2.2. Determinar la expresión del gen TaPT1 y TaPT2**

Mediante “northern blot” se analizó la expresión de dos genes que codifican transportadores de fosfato de alta afinidad en trigo (TaPT1 y TaPT2). Para TaPT2, la mayor expresión se observó en raíces de plantas mantenidas por 5 y 7 días en ausencia de P. Aun cuando de menor intensidad, también se observó expresión en hojas y raíces de plantas mantenidas en presencia de P. La secuencia nucleotídica del transportador TaPT1 tiene alta identidad con TaPT2, razón por la cual el diseño de la sonda para TaPT1 no permitió diferenciar claramente entre la expresión de TaPT1 y TaPT2. Para discriminar entre ambos transportadores se utilizó RT-PCR con partidores específicos para cada uno. Los resultados de este experimento sugirieron una expresión diferencial de estos genes, principalmente TaPT2, regulada negativamente por disponibilidad de P en raíces de trigo. No se obtuvo una señal adecuada para TaPT1.

*De acuerdo a los resultados de esta actividad, se encontró evidencia de regulación por fósforo sólo para el promotor del gen TaPT2 de trigo.*

### **ACTIVIDAD 2.2.3. Aislar la región 5' del gen TaPT1 y TaPT2**

Utilizando el kit “Genome Walker “ (Clontech), en esta actividad se logró aislar un segmento genómico de 2,5 kb que contendría la región 5' del gen TaPT1. De la misma forma, se logró aislar un segmento genómico de 1,1 kb que contendría la región 5' de TaPT2, cuya secuencia 5' hasta ahora es desconocida. Se realizaron diferentes intentos para aislar una secuencia promotora de mayor extensión para TaPT2, para lo cual se crearon 6 librerías genómicas adicionales a las provistas en el kit. Los productos obtenidos para ser aislados no superaron en ningún caso los 0,55 kb. Los segmentos genómicos aislados se ligaron al plasmidio pLMB6.

*En esta actividad se aisló segmentos genómicos de los transportador de fosfato de alta afinidad AtPT1 y AtPT2 de trigo. Con este resultado se da cumplimiento a lo comprometido en el proyecto.*

### **ACTIVIDAD 2.2.4. Amplificar y clonar la región 5' del gen TaPT2**

El proyecto inicialmente consideró el aislamiento de promotor del gen TaPT1 de trigo. Según los resultados obtenidos en ensayos del tipo “northern blot” y RT-PCR para TaPT1 y TaPT2, sólo la expresión de TaPT2 es específica de raíces y regulada positivamente por la deficiencia de fosfatos. Consecuentemente, esta actividad se concentró exclusivamente en el aislamiento de la región promotora

del gen TaPT2. Se utilizó el kit Genome Walker para obtener una secuencia promotora río arriba del gen TaPT2, el cual codifica para el transportador de fosfato de alta afinidad en trigo. El producto resultante (0,55 kb) se clonó en pGEM-T (Promega) y se secuenció. La putativa caja TATA de este promotor se encuentra en la región -33 del sitio de inicio de la traducción. En la secuencia del promotor TaPT2 también se identificaron sitios de unión a factores de transcripción relacionados a respuesta a estrés a tejido especificidad, y a sitios de unión a factores de transcripción de tipo MYB, que recientemente se han relacionado a genes regulados por fósforo.

*En esta actividad se amplificó, clonó y secuenció 0,55 kb el promotor del gen que codifica al transportador de fosfato de alta afinidad TaPT2 de trigo. TaPT2 se utilizó en los estudios de expresión de transportadores de fosfato en el genoma de trigo.*

#### **ACTIVIDAD 2.2.5. Construir fusión entre el promotor TaPT2 y el gen reportero gus**

Con la secuencia del promotor de TaPT2 conocida e inserta en pLMB6, ésta se reamplificó y clonó para generar pLMB8, disponiéndose de este modo de nuevos sitios de restricción para subclonar directamente en pBI101.1. De esta manera se obtuvo el vector pLMB9, el que se utilizará para la transformación de trigo. El diseño de la construcción TaPT2-gus se indica en la Figura 1.

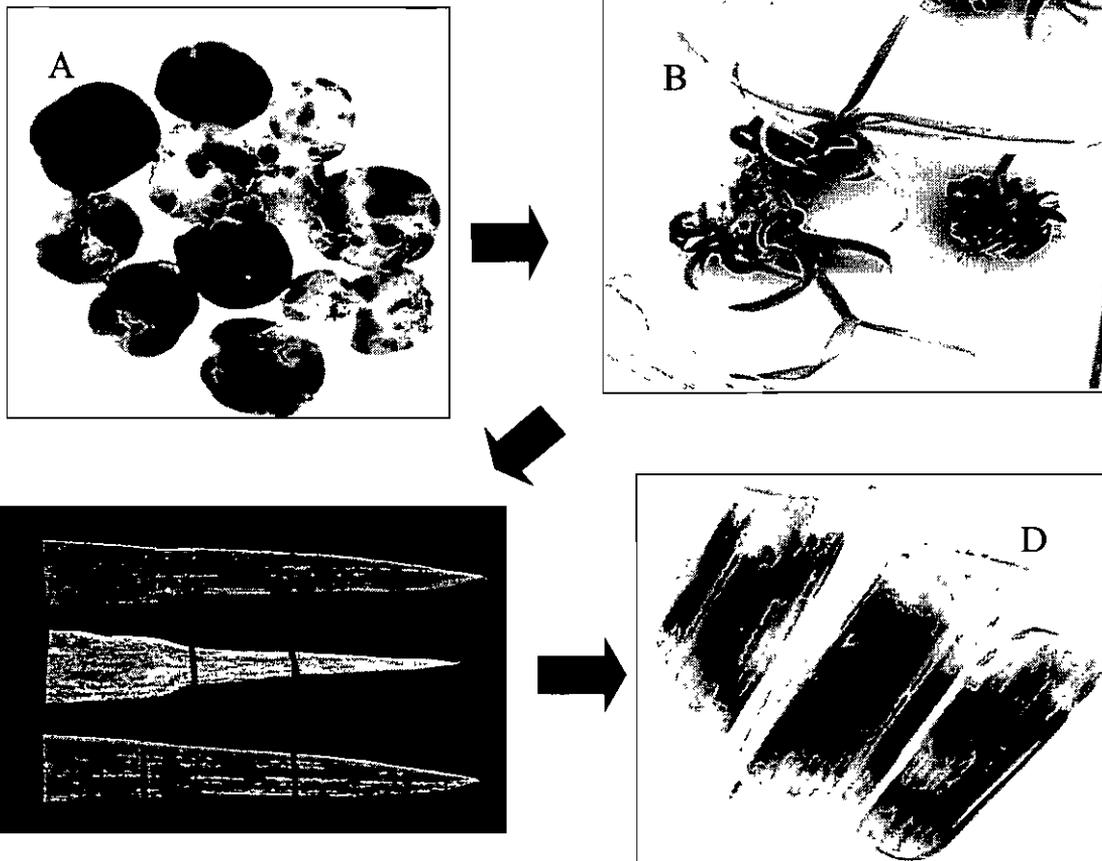
*En esta actividad se realizó la construcción TaPT2 fusionado al gen reportero gus (TaPT2-gus), la que se utilizará para estudiar la funcionalidad de este promotor en trigo transgénico. Con este resultado se da cumplimiento a lo comprometido en este proyecto.*

### **OBJETIVO ESPECIFICO 3**

#### **ACTIVIDAD 3.1. Optimizar las condiciones de transformación de cultivares de trigo chileno**

Las condiciones de transformación inicialmente planteadas en el proyecto no generaron expresión transciente del gen *gus*, cuando se utilizaron células escutelares del cultivar Bobwhite. Por tal razón, se modificó el protocolo original en lo que respecta a distancias entre disco de ruptura y macrocarrier, distancia de vuelo del macrocarrier y presión de bombardeo. Utilizando finalmente una mayor presión se logró una óptima condición de bombardeo, observándose que el 100% de los aproximadamente 1000 embriones jóvenes evaluados presentó expresión transciente del gen *gus* en el cultivar Bobwhite. Una vez establecidas las condiciones de transformación, se bombardearon células embrionarias de los cultivares Dalcahue-INIA y Dollinco-INIA. Se observó expresión transciente en prácticamente todos los embriones bombardeados (Figura 2).

*Mediante modificaciones a los protocolos iniciales, en esta actividad se demostró la factibilidad de transformar trigo chileno, de manera similar al cv. modelo Bobwhite.*



**Figura 2.** *Expresión transiente del gen gus en embriones de trigo (A), capacidad de regeneración de plantas transformadas en cultivares de trigo chileno (B), expresión del gen bar en hojas confiriendo resistencia al herbicida Basta (C), y expresión constitutiva gus (tinción oscura) en hojas de trigo.*

### **ACTIVIDAD 3.2. Evaluar expresión transciente con el gen *gus***

No se observaron diferencias en expresión transciente entre los cultivares de trigo evaluados en la Actividad 3.1 (Bobwhite, Dalcahue y Dollinco). Con el propósito de determinar la integración de genes en forma estable, se inició la evaluación de la habilidad regenerativa de los embriones transformados, observándose una excelente capacidad regenerativa en el cultivar Bobwhite. Se detectó adecuada acción del agente de selección (glufosinato, ingrediente activo del herbicida Basta), ya que los embriones control (no transformados con el gen de tolerancia a herbicida) presentaron baja proporción de escape. Sin embargo, estas plantas (que pudieran corresponder a potenciales escapes) no evidenciaron un estado vigoroso a nivel foliar ni radical. Estas observaciones indicaron que el cultivar Dalcahue-INIA parece sobresalir en su habilidad regenerativa. Los estudios de expresión transciente permitieron detectar la presencia de más de un evento de transformación, Esta observación es de relevancia ya que diversos sitios de integración aumentan la eficiencia de transformación y generan una mayor variabilidad de posiciones genéticas del transgen.

*En esta actividad se demostró expresión transciente del gen reportero *gus* en trigo. Se identificaron plantas tolerantes al herbicida, lo que indica una expresión estable del gen *bar* integrado en el genoma de trigo. Entre los trigos chilenos, el cultivar Dalcahue-INIA se vislumbra con mayores capacidades de regeneración y transformación.*

## **OBJETIVO ESPECIFICO 4**

### **ACTIVIDAD 4.1. Transformar trigo con el gen *gus* y *bar*, y nuevos promotores**

No obstante el cv. Dalcahue correspondió a aquel con mayor receptividad a la transformación genética entre los cvs. chilenos, esta variedad no presentó adecuada capacidad de regeneración en comparación con la variedad modelo para transformación. Consecuentemente, estos estudios se realizaron en el cv. Bobwhite, con el propósito de asegurar un número aceptable de líneas transgénicas necesarias para evaluar la funcionalidad de el/los promotores. En esta actividad se transformó trigo Bobwhite con los promotores AtPT1, AtPT2 y TaPT2 ligados al gen reportero *gus*, bajo un esquema de co-transformación con la construcción *Ubi-bar* como gen de selección. Paralelamente, se transformó trigos con la construcción *Actin-gus*, debido a que el promotor *Actin* ha mostrado en otros experimentos mayor actividad radical que el promotor *Ubi*. Se transformó 2345 embriones para la construcción *AtPT1-gus*, 1150 embriones para *AtPT2-gus* y 1365 embriones para *TaPT2-gus*. Para los promotores constitutivos fusionados al gen reportero *gus* se transformaron 700 embriones (*Actina-gus*) y 777 embriones (*Ubi-gus*).

*En esta actividad se transformó trigo con las construcciones *AtPT1-gus*, *AtPT2-gus* y *TaPT2-gus*. Estas construcciones se utilizaron para evaluar la funcionalidad de los promotores en  $T_2$ .*

### **ACTIVIDAD 4.2. Obtención de líneas transgénicas $T_0$**

Se obtuvieron 10 líneas transgénicas  $T_0$  con la construcción *Ubi-gus* y *Actina-gus* co-integradas a *Ubi-bar*. Por otra parte, se generaron 20 líneas transgénicas  $T_0$  bajo el esquema de co-transformación con los genes de selección *bar* y gen reportero *gus* bajo la acción de los promotores AtPT1, AtPT2 y TaPT2 (*AtPT1-gus*, *AtPT2-gus*, *TaPT2-gus*). Las líneas transgénicas se confirmaron fenotípicamente en invernadero por su tolerancia al herbicida Basta.

*En esta actividad se generaron líneas transgénicas  $T_0$  con las construcciones *AtPT1-gus*, *AtPT2-gus*, *TaPT2-gus*, *Ubi-gus* y *Actin-gus*.*

#### **ACTIVIDAD 4.3. Evaluar genética y molecularmente líneas transgénicas T<sub>0 a 2</sub>**

En líneas transgénicas tolerantes a herbicida Basta, se amplificó el gen *bar* y los promotores AtPT1, AtPT2 y TaPT2 fusionados a *gus*. La herencia del transgen se caracterizó en cada línea T<sub>0</sub> obteniéndose, en la mayoría de los casos, un patrón de segregación típico de un loci 3:1. Para el promotor AtPT1 se identificaron 13 líneas a nivel molecular y genético con el gen de interés (AtPT1-*gus*), más el gen de selección (*Ubi-bar*). Para el promotor AtPT2 se identificaron cuatro líneas a nivel molecular y genético con el gen de interés (AtPT2-*gus*) más el gen de selección (*Ubi-bar*). Para el promotor TaPT2 se identificaron ocho líneas a nivel molecular y genético con el gen de interés (TaPT2-*gus*) más el gen de selección (*Ubi-bar*). Las líneas confirmadas a nivel molecular y genético se avanzaron a T<sub>2</sub>, donde se utilizaron para los estudios de expresión del promotor bajo estrés de fosfatos.

Debido a la dificultad de identificar líneas con expresión constitutiva del gen reportero *gus*, se realizó análisis histoquímico en tres de ellas. Se observó expresión de la proteína Gus en tejido foliar, pero ausencia a expresión en tejido radical. Esta situación se repitió en análisis histoquímicos adicionales, y en nuevas transformaciones. Por tal razón, se optó por utilizar otro promotor para dirigir la expresión constitutiva *gus*. En *Hordeum vulgare*, recientemente se demostró que el promotor Actina presenta un nivel de expresión constitutiva superior al gen *gus*. Puesto que *H. vulgare* es una especie muy cercana a trigo, se postuló que podría obtenerse mejor nivel de expresión con este promotor constitutivo en trigo. No se logró resultados positivos con este nuevo promotor, por lo que se reintentó nuevamente con *Ubi*. No obstante los intentos, sólo se logró expresión en hojas y no en raíces. Consecuentemente, no fue posible obtener construcciones funcionales con algún promotor constitutivo.

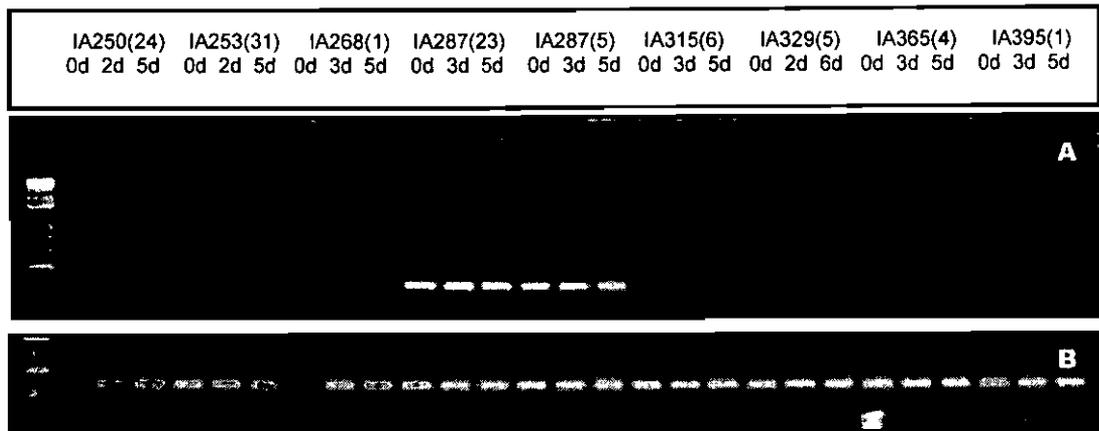
*En esta actividad se identificaron genética y molecularmente líneas de trigo transgénico para las construcciones AtPT1-gus, AtPT2-gus y TaPT2-gus. No obstante tres intentos (ubiquitina, actina y nuevamente ubiquitina), no fue posible obtener expresión constitutiva en raíces de trigo.*

#### **ACTIVIDAD 4.4. Evaluar el nivel de expresión de los nuevos promotores en líneas T<sub>2</sub>**

Se evaluó la funcionalidad de líneas T<sub>2</sub> correspondientes a eventos de transformación independiente con las construcciones AtPT1-*gus*, AtPT2-*gus* y TaPT2-*gus*. Estos estudios consideraron análisis de expresión de transcritos *gus* mediante RT-PCR, cuantificación de actividad Gus mediante fluorometría, y tinción histoquímica Gus.

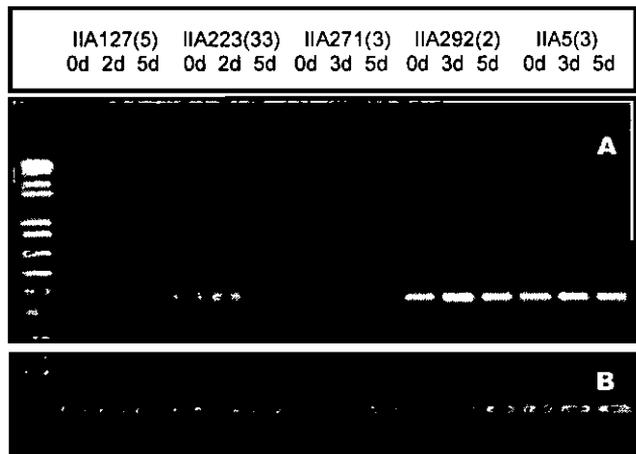
Mediante RT-PCR, y utilizando número de ciclos PCR a saturación (38 ciclos), se detectó expresión de transcritos *gus* en 2 de 9, 3 de 5 y 2 de 6 líneas T<sub>2</sub> transformadas con las construcciones AtPT1-*gus*, AtPT2-*gus* y TaPT2-*gus*, respectivamente (Figuras 3, 4 y 5). Puesto que estos análisis se hicieron en líneas previamente confirmadas por PCR para los genes *gus*, *bar* y el promotor correspondiente, los resultados indican que la transcripción del gen *gus* ocurrió en aproximadamente el 35% de las líneas T<sub>2</sub>.

La cuantificación de actividad Gus en las líneas RT-PCR positivas permitió detectar niveles de actividad específica Gus fluctuante entre 0,1 y 1,4 pmoles MU min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup> (Figura 6). Considerando la actividad promedio para cada promotor, ésta fue superior en la construcción AtPT2-*gus*, comparada con las construcciones AtPT1-*gus* y TaPT2-*gus*. Este nivel de actividad es significativamente inferior al informado en construcciones similares en genomas homólogos (promotor de *Arabidopsis* en *Arabidopsis*), pero está dentro del rango de construcciones similares en genomas heterólogos (promotor de cebada en arroz) (Schunmann et al., 2004). Estos autores lograron incrementar 20 veces la actividad Gus, cuando sus construcciones se complementaron con la adición del intrón 1 del gen de la alcohol dehidrogenasa (*adh1*).

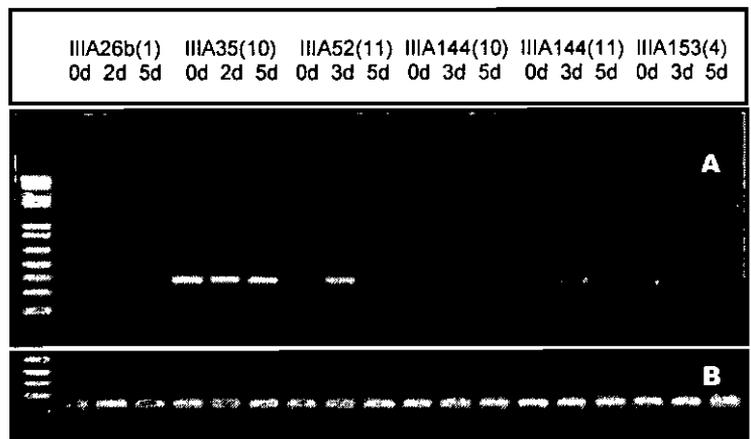


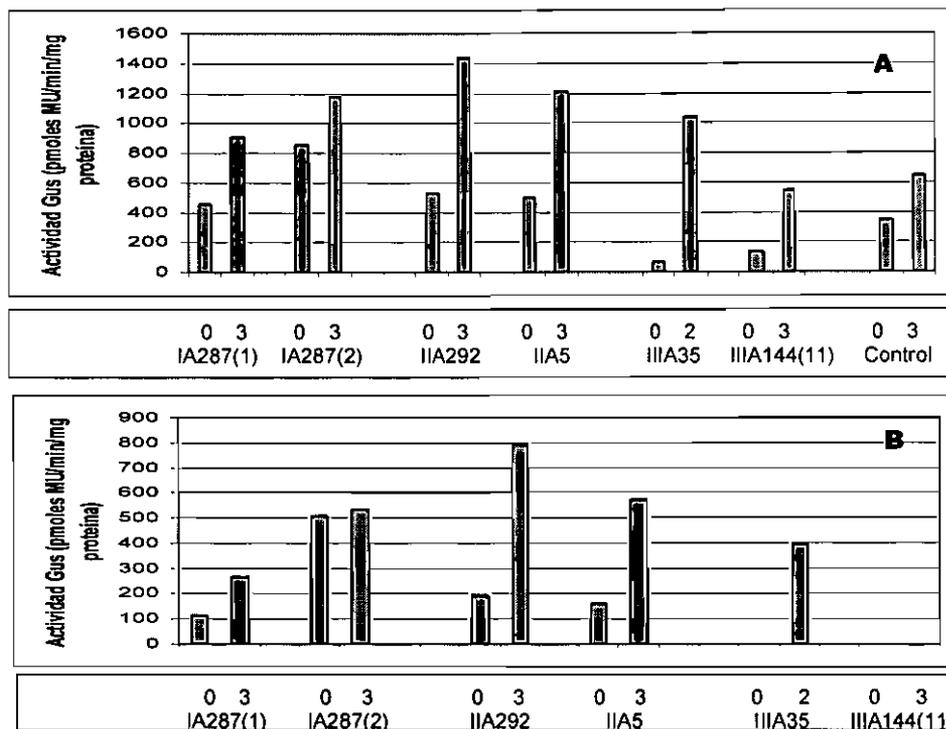
**Figura 3. A.** Expresión de transcritos *gus* en nueve líneas transgénicas  $T_2$  con la construcción *AtPT1-gus*, evaluados mediante RT-PCR. Los análisis se realizaron a partir de ARN total extraído desde tejido radical muestreado a los 0, 2-3 y 5-6 días posterior al traspaso de las plantas desde solución nutritiva conteniendo 0,2 mM Pi a solución nutritiva carente de Pi. **B.** Expresión de transcritos del gen ribosomal 28S utilizado como control interno.

**Figura 4. A.** Expresión de transcritos *gus* en cinco líneas transgénicas  $T_2$  con la construcción *AtPT2-gus*, evaluados mediante RT-PCR. Los análisis se realizaron a partir de ARN total extraído desde tejido radical muestreado a los 0, 2-3 y 5 días posterior al traspaso de las plantas desde solución nutritiva conteniendo 0,2 mM Pi a solución nutritiva carente de Pi. **B.** Expresión de transcritos del gen ribosomal 28S utilizado como control interno.



**Figura 5. A.** Expresión de transcritos *gus* en seis líneas transgénicas  $T_2$  con la construcción *TaPT2-gus* evaluados mediante RT-PCR. Los análisis se realizaron a partir de ARN total extraído desde tejido radical muestreado a los 0, 2-3 y 5 días posterior al traspaso de las plantas desde solución nutritiva conteniendo 0,2 mM Pi a solución nutritiva carente de Pi. **B.** Expresión de transcritos del gen ribosomal 28S utilizado como control interno.



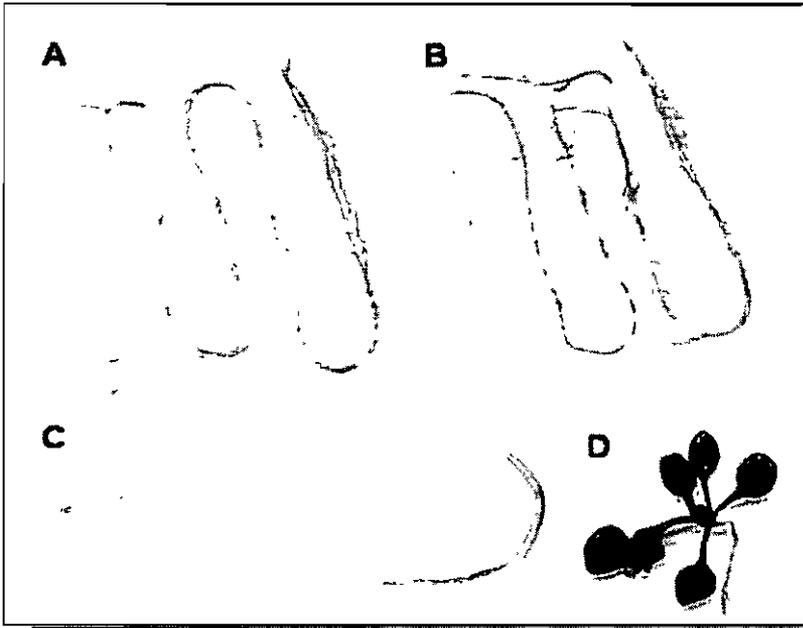


**Figura 6. A.** Actividad específica Gus en seis líneas transgénicas  $T_2$  con la construcción AtPT1-gus (IA.), AtPT2-gus (IIA.) y TaPT2-gus (IIIA.) evaluada mediante fluorometría. Los análisis se realizaron en líneas RT-PCR positivas, a partir extractos muestreado a los 0 y 2-3 días posterior al traspaso de las plantas desde solución nutritiva conteniendo 0,2 mM Pi a solución nutritiva carente de Pi. Como control se utilizó una línea transgénica RT-PCR negativo (IIA127). En (B) se presenta la actividad Gus de cada línea, menos la actividad detectada en la línea transgénica utilizada como control.

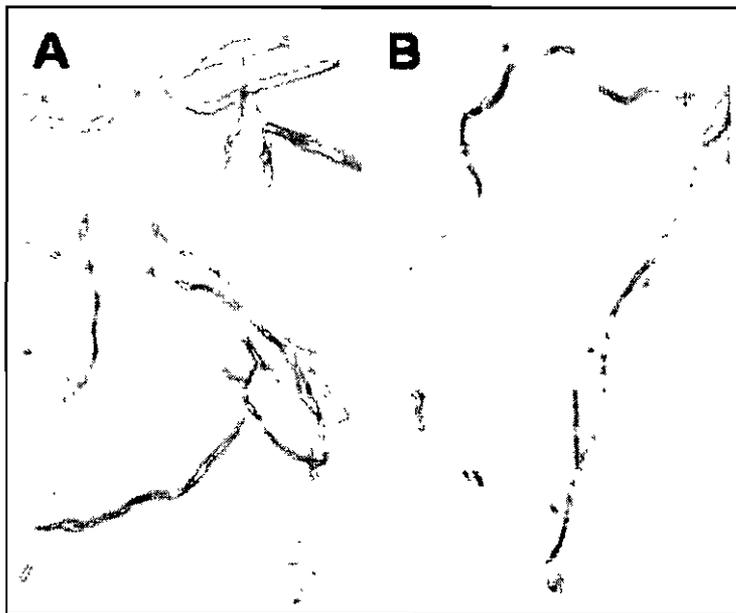
Los análisis histoquímicos detectaron tinción atribuible a la proteína Gus en raíces de trigo Bobwhite transformado con las tres construcciones, sólo en ausencia de fósforo. La intensidad de la tinción fue bastante menor que lo observado para un promotor constitutivo en *Arabidopsis*, sugiriendo que la actividad promotora no es muy elevada. Además, se observó que la tinción no fue homogénea a lo largo de toda la raíz (Figura 7, A, B y C), observándose que la mayor intensidad ocurrió con el promotor AtPT2.

En suelo, las plantas manifestaron una tinción aún más baja que la observada en hidroponía y con una distribución más heterogénea (Figura 8, A y B). Interesantemente, la construcción con el promotor AtPT2 presentó la tinción más intensa en suelo. Esta baja actividad promotora pareciera ser una característica de los promotores de transportadores de fosfato en cereales. En efecto, una situación similar se ha descrito para los promotores de cebada (Schunmann et al., 2004), y para AtPT2 en maíz ([http://mcknight.ccrp.cornell.edu/program\\_docs/project\\_documents/cereal\\_roots/SO\\_progressrep\\_02-03\\_yr1\\_17sep03.pdf](http://mcknight.ccrp.cornell.edu/program_docs/project_documents/cereal_roots/SO_progressrep_02-03_yr1_17sep03.pdf)). En función a estos resultados, y considerando: a) evidencia histoquímica en *Arabidopsis* que indica que la expresión Gus modulada por AtPT2 es más raíz-específica que AtPT1, b) que en suelo sólo se observó tinción Gus evidente sólo con el promotor AtPT2, se seleccionó el promotor de *Arabidopsis* AtPT2 para dirigir la expresión inducible de genes de lupino en trigo. Sobre la base de la evidencia informada por Schunmann et al. (2004), las construcciones con AtPT2 se complementaron con la introducción del intrón *adh1*.

En esta actividad se demostró la funcionalidad de AtPT1, AtPT2 y TaPT2 en trigo. Entre estos promotores, se seleccionó el promotor de *Arabidopsis* AtPT2 para dirigir la expresión inducible de genes de lupino en trigo. Con este resultado se da cumplimiento a la meta inicialmente propuesta en el proyecto.



**Figura 7.** Tinción histoquímica de raíces de plantas transformadas con el gen gus fusionado al promotor TaPT2 de trigo (A) y AtPT2 de Arabidopsis (B, C). Las plantas se cultivaron en hidroponía por 7 días en presencia de 0,1 mM P, para luego ser traspasadas por 4 días a hidroponía en ausencia de P. En (D) se presenta la tinción de una planta de Arabidopsis transformada con la construcción 35S-gus, utilizada como control positivo de la reacción de tinción.



**Figura 8.** Tinción histoquímica de raíces de trigo transformado con el gen gus fusionado al promotor AtPT2, cultivadas en suelo. En (A) y (B) se muestra el resultado de tinciones de dos plantas mantenidas por 46 días en ausencia de P.

## OBJETIVO ESPECIFICO 5

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

**Exudación de ácidos orgánicos.** Se observó bajo nivel de exudados de citrato y malato en el sistema radical de los cinco cultivares de trigo evaluados. Estas tasas de exudación en trigos difieren significativamente de aquella observada en *L.albus*, y corresponden a niveles basales característicos de difusión pasiva de metabolitos.

**Actividad PEPC.** PEPC es una enzima que participa en la síntesis y acumulación de ácidos orgánicos en plantas de *L.albus* deficientes en P. Con el propósito de comparar la actividad PEPC entre especies divergentes en términos de su contenido de proteína total (trigos vs. *L.albus*), la actividad PEPC se expresó como Unidades de actividad. De acuerdo a estas comparaciones, la actividad PEPC no difiere entre trigos y *L. albus*, en plantas de 16 días en ausencia de P. Sin embargo, la actividad PEPC en *L. albus* esta es significativamente superior a trigos, cuando la enzima se extrae desde conglomerados maduros de una raíz proteoidea, precisamente el tejido desde donde se aislaron los cADN de PEPC clonados en este proyecto.

**Concentración de metabolitos.** La concentración promedio de citrato en trigos no difirió marcadamente ya sea entre fechas de muestreo o entre genotipos. La mayor concentración de citrato se observó en el cv. Dalcahue en ausencia de P y correspondió a 2  $\mu\text{moles g}^{-1}$  peso fresco. En promedio, la concentración de malato fue 3 a 4 veces superior a citrato en raíces de todos los genotipos de trigo evaluados. Sin embargo, el promedio no superó los 7  $\mu\text{moles g}^{-1}$  peso fresco. En contraste a citrato, este ácido orgánico se redujo significativamente en presencia de P, indicando que su concentración es modulada por la disponibilidad de P en el tejido radical. En trigos, la concentración de malato no se correlacionó con las tasas de exudación. La excepción parece corresponder a HS, genotipo donde se observó la mayor tasa de exudación de malato (7  $\text{nmoles h}^{-1}$  planta $^{-1}$ ), consistente con su comparativamente alta concentración en el tejido (7  $\mu\text{moles g}^{-1}$  peso fresco).

Fosfoenolpiruvato (PEP) corresponde al sustrato de la enzima PEPC. Comparado con lo observado para citrato y malato, la concentración de este metabolito en tejidos radicales de genotipos de trigo no difirió marcadamente de aquella que caracterizó a *L. albus*. No obstante, se debe mencionar que las evaluaciones se realizaron en plantas de una misma edad cronológica, pero en diferentes estados fenológico (16 día en ausencia de P). Consecuentemente, la concentración de PEP a 16 días en ausencia de P no necesariamente refleja lo que ocurre en estructuras radicales de *L. albus* que exudan citrato, cuya aparición en la planta ocurre aproximadamente a los 222-24 días en esta condición.

*En esta actividad se evaluó la actividad PEPC y metabolitos en trigo no transformado. Los resultados reflejan la situación actual en esta especie, que se pretende modificar mediante transgénesis en este proyecto.*

### ACTIVIDAD 5.2. Construir fusión entre promotor identificado y PEPC

Se realizaron las construcciones con los promotores constitutivos Actina-PEPC36 y Ubi-PEPC36 fusionados a la secuencia terminadora NosT de *Agrobacterium*, e incluyendo un sitio múltiple de clonamiento (SMC) para facilitar la inserción de diversos genes. También se realizaron las construcciones con el promotor inducible AtPT2 fusionado a PEPC36 (AtPT2-PEPC36) y a la secuencia NosT, así como esta misma construcción a la cual se le insertó el intrón *Adh1* de maíz (AtPT2-adh-PEPC36).

*En esta actividad se desarrollaron dos construcciones génicas de expresión constitutiva (Actin-PEPC36 y Ubi-PEPC36) y dos construcciones moduladas por un promotor inducible por la deficiencia de fósforo (AtPT2-PEPC36 y AtPT2-adh-PEPC36).*

### **ACTIVIDAD 5.3. Transformar trigos con el gen PEPC**

Se transformaron 1627 embriones de trigo Bobwhite con la construcción AtPT2-adh-PEPC36-NosT, 1190 embriones con la construcción AtPT2-PEPC36-NosT y 1212 embriones con la construcción *Ubi*-PEPC36-NosT. De estos embriones se logró regenerar 99, 45 y 14 plantas, respectivamente. En todos los casos se utilizó un esquema de co-transformación para cada gen de interés, con la construcción *Ubi-bar* como gen de selección. En estas construcciones, el fenotipo Bar fue positivo en 45 de 99 para AtPT2-adh-PEPC36-NosT, 26 de 45 para AtPT2-PEPC36-NosT, y de 14 para *Ubi*-PEPC36-NosT. Considerando el número de embriones transformados como referencia, el porcentaje de plantas regeneradas correspondió a 6,8% en la construcción AtPT2-adh-PEPC36-NosT, 3,8% en la construcción AtPT2-PEPC36-NosT y 1,1% en la construcción *Ubi*-PEPC36-NosT.

*En esta actividad se transformó trigo bobwhite con la región codificante de PEPC36 modulada por el promotor inducible AtPT2 y el promotor constitutivo Ubi, con porcentajes de regeneración fluctuantes entre 6,8 y 1,1%.*

### **ACTIVIDAD 5.4. Obtener líneas transgénicas T<sub>0</sub> con el gen PEPC36 de *L. albus*.**

Entre las transformaciones realizadas con la región codificante PEPC36 (*Actin*-PEPC36, *Ubi*-PEPC36, AtPT2-PEPC36 y AtPT2-adh-PEPC36) co-integradas con la construcción *Ubi-bar* como gen de selección, en ésta y las siguientes actividades (5.5 y 5.6) sólo se presentan y discuten los resultados de la construcción AtPT2-adh-PEPC36. Lo anterior con el objetivo de realizar un análisis detallado en la evolución desde la generación T<sub>0</sub> a T<sub>2</sub>. En esta construcción se obtuvieron 17 líneas transgénicas T<sub>0</sub> con el gen PEPC36 bajo la acción del promotor modulado AtPT2 y el intron adh (AtPT2-adh-PEPC36). Las líneas y su sinonimia se indican en la Tabla 1.

*En esta actividad se generaron 17 líneas de la construcción AtPT2-adh-PEPC. Estas líneas se avanzaron a la siguiente generación para los análisis genético-moleculares.*

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

Para el análisis genético-molecular se amplificó por PCR distintos segmentos de la construcción AtPT2-adh-PEPC36-NosT integrada en el genoma de trigo, utilizando partidores específicos que cubrieron tanto el segmento AtPT2-adh-PEPC36 (PCR1, 891 bp) como el segmento PEPC36-NosT (PCR2, 428 pb). El diseño de esta construcción, así como la posición de los partidores se indican en la Figura 1.

En la Tabla 1 se muestra el resultado de la amplificación de distintas fracciones de la construcción. Se observan eventos positivos para todos los fragmentos amplificados. Sin embargo, y no obstante tener gran parte de la construcción integrada, no se logró amplificar alguno de los dos fragmentos de la construcción en las líneas 12, 15 y 17. Aun cuando existe la posibilidad de fraccionamiento de transgenes, o de errores en el PCR, no se dispone de información suficiente para atribuir esta discrepancia a alguna de las causas mencionadas.

*En esta actividad se analizó molecularmente 17 eventos T<sub>0</sub> de la construcción AtPT2-adh-PEPC36-NosT. En 14 de ellos se confirmó la presencia de transgén en el genoma Bobwhite.*

**Tabla 1. Análisis molecular de líneas transgénicas T<sub>0</sub> de la construcción AtPT2-adh-PEPC36.**

Nº	LÍNEA	AtPT2-adh-PC36	AtPT2-adh	PC36-NOST
1	VII A 714(3)	+	+	+
2	VII A 738b(1)	+	+	+
3	VII A 738c	+	+	+
4	VII A 745a	+	+	+
5	VII A 745c(1)	+	+	+
6	VII A 745c(2)	+	+	+
7	VII A 745c(3)	+	+	+
8	VII A 745c(4)	+	+	+
9	VII A 745c(5)	+	+	+
10	VII A 745c(6)	+	+	+
11	VII A 775c(1)	+	+	+
12	VII A 783(1)	-	+	+
13	VII A 785(1)	+	+	+
14	VII A 793(1)	+	+	+
15	VII A 796a(1)	-	+	+
16	VII A 745c(7)	+	+	+
17	VII A 706b	+	-	+

Signo (+) corresponde a presencia del fragmento amplificado y signo (-) ausencia.

**ACTIVIDAD 5.6. Analizar genética y molecularmente líneas transgénicas T<sub>1-2</sub>**

En la Tabla 2 se muestra el análisis fenotípico (resistencia al herbicida Basta) de líneas transgénicas T<sub>1</sub> obtenidas a partir de la autopolinización de la generación T<sub>0</sub>. Aun cuando se trató de analizar una progenie de 20 individuos segregantes de cada evento independiente T<sub>0</sub>, en algunos casos y dado la época del año, no fue factible por la baja fertilidad de flores en espigas. Aun cuando en líneas con mayor progenie los valores son cercanos al 75% esperado de plantas (+) para la integración de un locus, en general se aprecia una segregación distorsionada del transgen. Considerando esta evidencia, sólo se seleccionaron las líneas 3, 8 y 10 para el análisis molecular.

**Tabla 2. Análisis fenotípico de líneas transgénicas T<sub>1</sub> de la construcción AtPT2-adh-PEPC36.**

VII [AtPT2-adh-PEPC36-NOST] (T <sub>0</sub> )						Fenotipo T <sub>1</sub>																					
Nº	LÍNEA	AtPT2-adh-PC36	AtPT2-adh	PC36-NOST	BAR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	%	
1	VII A 738b(1)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	65
2	VII A 738c(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
3	VII A 745a(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90
5	VII A 745c(2)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	57
6	VII A 745c(3)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	79
7	VII A 745c(5)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
8	VII A 745c(6)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	82
9	VII A 783(1)	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	75
10	VII A 785(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	80
11	VII A 738b(2)	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	60
12	VII A 738c(1)	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	53
13	VII A 738a(1)	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	73
14	VII A 689a(1)	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
15	VII A 708(1)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	55
16	VII A 747a(1)	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	80
17	VII A 779c(1)	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	40

En el Tabla 3 se muestra el análisis molecular de las líneas T<sub>1</sub> seleccionadas para determinar la ocurrencia o no de co-integración de los genes de interés y el gen de selección. De las tres líneas, la línea 10 pareciera tener los genes de interés y de selección integrados en distintos loci en el genoma de trigo, por lo que podrían estar segregando independientemente.

**Tabla 3. Caracterización molecular de líneas transgénicas T<sub>1</sub> de la construcción AtPT2-adh-PEPC36.**

VII (AtPT2-adh-PEPC36-NOST)					
N°	LINEA	N° TUBO	AtPT2-adh-PC36	PC36-NOST	T1
8	VII A 745c(6)9	VII-8-9	-	+	+
8	VII A 745c(6)4	VII-8-4	-	+	+
8	VII A 745c(6)8	VII-8-8	+	+	+
8	VII A 745c(6)7	VII-8-7	-	+	+
8	VII A 745c(6)5	VII-8-5	+	+	+
8	VII A 745c(6)3	VII-8-3	-	+	+
8	VII A 745c(6)10	VII-8-10	+	+	+
10	VII A 785(1)19	VII-10-19	+	+	+
10	VII A 785(1)15	VII-10-15	+	+	+
10	VII A 785(1)6	VII-10-6	+	+	-
10	VII A 785(1)5	VII-10-5	+	+	+
10	VII A 785(1)3	VII-10-3	+	+	+
10	VII A 785(1)16	VII-10-16	+	+	+
10	VII A 785(1)13	VII-10-13	+	+	+
10	VII A 785(1)1	VII-10-1	+	+	+
3	VII A 745a(1)8	VII-3-8	+	+	+
3	VII A 745a(1)3	VII-3-3	+	+	+
3	VII A 745a(1)15	VII-3-15	+	+	+

De acuerdo a la información disponible en la Tabla 4, la línea No 10 presenta baja ocurrencia de plantas tolerantes al herbicida Basta (fenotipo), lo que indicaría una planta completamente heterocigota. Esto pudiera atribuirse tanto al bajo número de plantas analizadas (15 plantas segregantes), así como a la presión de selección ocurrida en generaciones anteriores guiadas por la presencia sólo de los genes de interés. En cambio, la línea 3 planta 8 (Código VII 3-8), presenta el 100% de su progenie resistente al herbicida, lo que indica que esta línea es homocigota. Para confirmar el patrón de segregación, las líneas 3, 8 y 10 se avanzaron a generación T<sub>2</sub>.

**Tabla 4. Caracterización genética de líneas transgénicas T<sub>1</sub> de la construcción AtPT2-adh-PEPC36.**

VII (AtPT2-adh-PEPC36-NOST)					FENOTIPO T2												SUELO			
N°	LINEA	CÓDIGO	AtPT2-adh	PC36-NOST	T1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
3	VII A 745a(1)3	VII-3-3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
3	VII A 745a(1)8	VII-3-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	VII A 745a(1)15	VII-3-15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
8	VII A 745c(6)3	VII-8-3	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
8	VII A 745c(6)5	VII-8-5	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
8	VII A 745c(6)8	VII-8-8	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
8	VII A 745c(6)10	VII-8-10	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
10	VII A 785(1)5	VII-10-5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
10	VII A 785(1)6	VII-10-6	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
10	VII A 785(1)13	VII-10-13	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
10	VII A 785(1)15	VII-10-15	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-

En este proyecto originalmente no se contempló la generación T<sub>2</sub>. Sin embargo, en esta actividad también se desarrolló la generación T<sub>2</sub> para poseer una mayor cantidad de plantas para las evaluaciones en hidroponía y aminorar algún posible efecto de dosis génica en la expresión de los genes. El análisis molecular de la generación T<sub>2</sub> se muestra en la Tabla 5. De esta tabla se desprende que, efectivamente, la línea 10 presenta una segregación independiente de los genes de interés y de selección. Más aun, evidencia la presencia de selección hacia los genes de interés, lo que explicaría la baja ocurrencia de plantas resistentes a herbicida Basta. Por otra parte, la línea 3 planta 8, presenta una co-segregación completa de los genes de interés y de selección. En consecuencia, esta línea está al estado homocigoto (ie. cada planta de este evento corresponde a una repetición).

**Tabla 5. Caracterización molecular de líneas transgénicas T<sub>2</sub> de la construcción AtPT2-adh-PEPC36.**

VII (AtPT2-adh-PEPC36-NOST)				PLANTAS T <sub>2</sub>												
N°	LÍNEA	CODIGO	chequeo	T1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3	VII A 745a(1)8	VII-3-8	FENOTIPO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	VII A 745a(1)8	VII-3-8	PC36-NOST	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	VII A 745a(1)8	VII-3-8	ATPT2-ADH-PC36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	VII A 745c(6)10	VII-8-10	FENOTIPO	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
8	VII A 745c(6)10	VII-8-10	PC36-NOST	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
8	VII A 745c(6)10	VII-8-10	ATPT2-ADH-PC36	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
10	VII A 785(1)5	VII-10-5	FENOTIPO	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	VII A 785(1)5	VII-10-5	PC36-NOST	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
10	VII A 785(1)5	VII-10-5	ATPT2-ADH-PC36	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
10	VII A 785(1)15	VII-10-15	FENOTIPO	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	VII A 785(1)15	VII-10-15	PC36-NOST	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	VII A 785(1)15	VII-10-15	ATPT2-ADH-PC36	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

En esta actividad se analizó genética y molecularmente 17 eventos T<sub>0</sub> de la construcción AtPT2-adh-PEPC36-NosT, de los cuales tres se avanzaron a T<sub>2</sub>. Sólo una línea resultó homocigota para el transgen y el gen de selección.

### ACTIVIDAD 5.7. Caracterizar fisiológicamente líneas transgénicas T<sub>0</sub>

Esta actividad se realizó en líneas de trigo transgénico T<sub>2</sub> previamente confirmadas tanto por genética como molecularmente en las actividades 5.4, 5.5 y 5.6 (presencia del transgen en el genoma mediante PCR), así como por la presencia de transcritos mediante qPCR. Los resultados de esta actividad se presentan y discuten en la Actividad 6.6., en conjunto con las construcciones que involucraron a MDH, así como a aquellas donde se co-integraron PEPC36 y MDH.

### ACTIVIDAD 5.8. Mapear físicamente el transgén en líneas elite T1

Esta actividad no se realizó por no disponer del equipo PCR "in situ". Sin embargo, su ejecución no se estima de relevancia para el objetivo central del proyecto, ni prioritaria, considerando la significativa cantidad de experimentos realizados durante su ejecución.

## OBJETIVO ESPECÍFICO 6

### ACTIVIDAD 6.1. Construir fusión entre promotor identificado y otros genes de *L. albus*

Para realizar la construcción con el promotor regulado se tomó como base el plasmidio pVAN-MDH, particularmente los sitios *Nco*I, *Nhe*I y *Not*I. En esta construcción, las modificaciones para introducir los sitios de restricción involucraron partidores con extremos libres de al menos 5 bases extras, de modo de digerir los fragmentos directamente una vez amplificados y evitar clonamientos en vectores TOPO. De esta forma se obtuvo la construcción AtPT2-adh-MDH. Mediante escisión de intrón *adh1* se obtuvo la construcción AtPT2-MDH, todas insertas en el vector pBluescript (Figura 1).

*En esta actividad se realizaron las construcciones con MDH fusionada al vector modulado AtPT2 con intrón (AtPT2-adh-MDH) y sin intrón (AtPT2-MDH).*

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

Se transformaron 1315 embriones de trigo Bobwhite con la construcción AtPT2-adh-MDH-NosT, 1164 embriones con la construcción AtPT2-MDH, 1300 embriones con la construcción AtPT2-adh-MDH-NosT co-integrada con la construcción AtPT2-adh-PEPC36-NosT, y 1344 embriones con la construcción AtPT2-MDH-NosT co-integrada con la construcción AtPT2-PEPC36-NosT. De estos embriones se logró regenerar 119, 49, 64 y 45 plantas, respectivamente. En todos los casos se utilizó un esquema de co-transformación para cada gen de interés, con la construcción *Ubi-bar* como gen de selección.

*Se transformó trigo Bobwhite con las construcciones AtPT2-MDH, AtPT2-adh-MDH, AtPT2-adh-MDH co-integrada con AtPT2-adh-PEPC36, y AtPT2-MDH co-integrada con AtPT2-PEPC36. En esta actividad se priorizó cuatro construcciones con dos genes, en reemplazo de tres genes comprometidos en el proyecto.*

### ACTIVIDAD 6.3. Obtención de líneas transgénicas $T_0$

En estas construcciones utilizadas en la actividad anterior para transformar trigo Bobwhite, el fenotipo Bar fue positivo en 84 de 119 plantas para AtPT2-adh-MDH-NosT, 13 de 49 plantas para AtPT2-MDH-NosT, 21 de 64 plantas para AtPT2-adh-MDH-NosT co-integrada con AtPT2-adh-PEPC36-NosT, y 12 de 25 plantas para la construcción AtPT2-PEPC36-NosT co-integrada con AtPT2-MDH-NosT. Considerando el número de embriones transformados como referencia, el porcentaje de plantas regeneradas correspondió a 9,0% en la construcción AtPT2-adh-MDH-NosT, 4,2% en la construcción AtPT2-PEPC36-NosT, 4,9% para AtPT2-adh-MDH-NosT co-integrada con AtPT2-adh-PEPC36-NosT, y 3,8% para AtPT2-PEPC36-NosT co-integrada con AtPT2-MDH-NosT.

*Se obtuvieron líneas  $T_0$  de cuatro construcciones, con porcentajes de regeneración de plantas fluctuantes entre 3,8 y 9%. Del total de construcciones con las cuales se transformó trigo Bobwhite, en las dos actividades siguientes se presenta y discute desde la generación  $T_0$  hasta  $T_2$  de las construcciones AtPT2-adh-MDH (Actividad 6.4), y de AtPT2-adh-MDH co-integrada con AtPT2-adh-PEPC36 (Actividad 6.5).*

**ACTIVIDAD 6.4. Analizar genética y molecularmente líneas T<sub>0.2</sub> de la construcción AtPT2-adh-MDH**

Se obtuvieron ocho eventos independientes T<sub>0</sub> con la construcción AtPT2-adh-MDH. En la Tabla 6 se muestran las líneas transgénicas, sus sinonimias, y la amplificación por PCR de los genes de interés. En todas las líneas se amplificó claramente el gen MDH con el terminal NosT y el gen de selección *bar*. Sin embargo el promotor AtPT2 con el intrón no se amplificó en las líneas 5, 6 y 7. De igual forma no fue posible amplificar los tres genes de interés en forma simultánea, a excepción de la línea 8. Dado que en todas las líneas se amplifican independientemente los genes de interés, es factible que esta discrepancia se deba al tamaño del producto PCR (854 bp). Asumiendo problemas de amplificación por PCR, se seleccionaron para los análisis genéticos y moleculares en T<sub>2</sub>, las líneas 2, 3 y 4. La línea 8 presentó esterilidad, por lo que no fue factible pasarla a la próxima generación.

**Tabla 6. Análisis molecular de líneas transgenicas T<sub>0</sub> de la construcción AtPT2-adh-MDH.**

AtPT2-adh-MDH-NosT						
Nº	Línea	Muestra	AtPT2-adh-MDH	AtPT2-adh	MDH-NOST	BAR
1	VIII A	92	-	+	+	+
2	VIII A	93	-	+	+	+
3	VIII A	113	-	+	+	+
4	VIII A	187	-	+	+	+
5	VIII A 44a	112	-	-	+	+
6	VIII A	114	-	-	+	+
7	VIII A 48	115	-	-	+	+
8	VII/VIII A	127	+	+	+	+

Para generar líneas homocigotas y determinar el número de loci donde se insertaron los genes de selección, de interés y si co-segregan o no con el gen de selección *bar*, se realizó un test de progenie en la generación T<sub>1</sub> (Tabla 7). Se observa que las líneas 1, 2, 3 y 4 son las más próximas a lo esperado para un loci único de integración del transgene (75%). Por otra parte la línea 7 presentó un 95% de progenie con el gen de selección *bar*. Esto no corresponde a lo esperado en una generación T<sub>1</sub>, pero pudiera aclararse analizando un número mayor de segregantes. Tanto la línea 7 como la línea 5 no presentaron una clara integración de los genes de interés en T<sub>0</sub> (Tabla 6). Adicionalmente, en la línea 5 se observó insegura integración de los genes de interés y baja fertilidad de flores, lo que generó baja disponibilidad de semillas para el análisis genético.

**Tabla 7. Análisis genético de líneas segregantes T<sub>1</sub> de la construcción AtPT2-adh-MDH**

AtPT2-adh-MDH-NosT						Fenotipo T1																							
Nº	LINEA	NºTUBO	AtPT2-adh-	AtPT2-adh	MDH-NOST	BAR	T0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	%	
1	VIII A 50(1)	92		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83
2	VIII A 50(2)	93		+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	74
3	VIII A 46b(1)	113		+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	76
4	VIII A 82a(1)	187		+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	76
5	VIII A 44a(1)	112	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
6	VIII A 46b(2)	114	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
7	VIII A 48(1)	115	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	95

De acuerdo a los resultados anteriores, sólo se analizaron molecularmente las líneas 2, 3 y 4, para determinar la co-integración o no de los transgenes. Este análisis indica que los genes de interés y gen de selección presentan co-integración en las tres líneas seleccionadas (Tabla 8), requiriéndose confirmar molecularmente cada planta en la próxima generación.

**Tabla 8. Análisis molecular de líneas segregantes T<sub>1</sub> de la construcción AtPT2-adh-MDH.**

AtPT2-adh-MDH-NosT					
Nº	LINEA	Nº TUBO	AtPT2-adh-MDH	MDH-NOST	T1
2	VIII A 50(2) 5	VIII-2-5	+	+	+
2	VIII A 50(2) 8	VIII-2-8	+	+	+
2	VIII A 50(2) 9	VIII-2-9	+	+	-
2	VIII A 50(2) 10	VIII-2-10	+	+	-
2	VIII A 50(2) 11	VIII-2-11	+	+	+
2	VIII A 50(2) 13	VIII-2-13	+	+	+
2	VIII A 50(2) 14	VIII-2-14	+	+	+
2	VIII A 50(2) 15	VIII-2-15	+	+	+
2	VIII A 50(2) 18	VIII-2-18	+	+	+
3	VIII A 46b(1)20	VIII-3-20	+	+	+
3	VIII A 46b(1)15	VIII-3-15	+	+	+
3	VIII A 46b(1)9	VIII-3-9	+	+	+
3	VIII A 46b(1)6	VIII-3-6	+	+	+
3	VIII A 46b(1)13	VIII-3-13	+	+	+
3	VIII A 46b(1)12	VIII-3-12	+	+	+
3	VIII A 46b(1)11	VIII-3-11	+	+	+
3	VIII A 46b(1)10	VIII-3-10	+	+	-
4	VIII A 82a(1)5	VIII-5-5	+	+	+
4	VIII A 82a(1)8	VIII-5-8	+	+	+
4	VIII A 82a(1)16	VIII-5-16	+	+	+
4	VIII A 82a(1)20	VIII-5-20	+	+	+
4	VIII A 82a(1)11	5-11	-	-	-

De acuerdo a la información molecular, genética y disponibilidad de semilla en T<sub>1</sub>, se seleccionaron las líneas 2 planta 11, línea 3 planta 20 y línea 4 plantas 16 y 11 para el desarrollo de la generación T<sub>2</sub>. En la Tabla 9 se muestra el análisis genético de segregantes T<sub>2</sub>. Como se observa, el loci del gen de selección *bar* continúa en estado heterocigoto en las líneas seleccionadas. En el caso de la línea 4 planta 11, al ser la generación T<sub>1</sub> (-) era esperable no poseer segregantes positivos en T<sub>2</sub>. Esto corrobora la condición heterocigota del transgen en esta línea y los análisis fenotípicos en T<sub>1</sub>.

**Tabla 9. Análisis genético de segregantes T<sub>2</sub> de la construcción AtPT2-adh-MDH.**

VIII (AtPT2-adh-MDH-NOST)					FENOTIPO T2												SUELO				
Nº	LINEA	CODIGO	AtPT2-adh	MDH-NOST	T1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	%
2	VIII A 50(2)11	VIII-2-11	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	60
3	VIII A 46b(1)20	VIII-3-20	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	87
4	VIII A 82a(1)16	VIII-5-16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87
4	VIII A 82a(1)11	VIII-5-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

Por consiguiente, fue necesario amplificar los genes de interés en las líneas seleccionadas para tener la certeza de la presencia del transgén. En la Tabla 10 se observa que las líneas 2, 3 y 4 continúan en condición heterocigota. Sin embargo, es muy probable que las plantas 20 y 16 de las líneas 3 y 4, presenten co-integración de los genes de interés y de selección. No es factible concluir con mayor precisión en esta generación, debido a que las ampliificaciones de algunos fragmentos de los transgenes presentan distorsiones. La posible co-integración de los genes se demuestra en la co-segregación de la no presencia de genes en la planta 11 de la misma línea 4.

**Tabla 10.** Caracterización molecular de líneas transgénicas  $T_2$  de la construcción AtPT2-adh-MDH.

AtPT2-adh-MDH-NosT					PLANTAS $T_2$											
Nº	Línea	Código	chequeo	T1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	VIII A 50(2)11	VIII-2-11	FENOTIPO	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
2	VIII A 50(2)11	VIII-2-11	MDH-NOST	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
2	VIII A 50(2)11	VIII-2-11	ATPT2-ADH-MDH	+	+	+	+	+			+	+				
3	VIII A 46b(1)20	VIII-3-20	FENOTIPO	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
3	VIII A 46b(1)20	VIII-3-20	MDH-NOST	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
3	VIII A 46b(1)20	VIII-3-20	ATPT2-ADH-MDH	+	+	+	+	+			+	+			+	+
4	VIII A 82a(1)16	VIII-5-16	FENOTIPO	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
4	VIII A 82a(1)16	VIII-5-16	MDH-NOST	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
4	VIII A 82a(1)16	VIII-5-16	ATPT2-ADH-MDH	+	+	+	-	+		+				+	+	+
4	VIII A 82a(1)11	VIII-5-11	FENOTIPO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	VIII A 82a(1)11	VIII-5-11	MDH-NOST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	VIII A 82a(1)11	VIII-5-11	ATPT2-ADH-MDH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

En esta actividad se analizaron genética y molecularmente los segregantes de la construcción AtPT2-adh-MDH. Se demostró homocigocis en solo una de cuatro líneas estudiadas en la generación  $T_2$ .

**ACTIVIDAD 6.5.** Analizar genética y molecularmente líneas  $T_{0,2}$  de la construcción AtPT2-adh-MDH co-integrada con la construcción AtPT2-adh-PEPC36

En esta construcción se combinaron dos genes de *L. albus* (PEPC36 y MDH), ambos fusionados al intron adh y bajo el control del promotor modulado AtPT2. En la Tabla 11 se muestra los 13 eventos independientes obtenidos con esta combinación de genes, junto al análisis molecular de líneas transgénicas  $T_0$ . A excepción de las líneas 8 y 9, todas presentan el gen de selección *bar* incorporado en su genoma. De manera similar a lo observado para otras construcciones, algunas líneas no presentan amplificación del fragmento AtPT2-adh-PC36 y AtPT2-adh-MDH. Como se explicó anteriormente, esto podría atribuirse a problemas de amplificación por PCR debido al tamaño del fragmento, más que eventual fragmentación de la construcción.

**Tabla 11.** Caracterización molecular de líneas transgénicas  $T_0$  de la construcción AtPT2-adh-MDH co-integrada con la construcción AtPT2-adh-PEPC36.

AtPT2-adh-PEPC36-NosT + AtPT2-adh-MDH-NosT							
Nº	LÍNEA	MUESTRA	AtPT2-adh-PC36-NOST	AtPT2-adh-MDH-NOST	PC36-NOST	MD-NOST	BAR
1	XVII A 9(1)	70	+	+	+	+	+
2	XVII A 12(2)	73	+	-	+	+	+
3	XVII A 15(1)	207	-	+	+	+	+
4	XVII A 21d(1)	213	+	+	+	+	+
5	XVII A 21d(2)	214	+	+	+	+	+
6	XVII A 43a	220	+	+	+	+	+
7	XVII A 9(1.1)	253	+	+	+	+	+
8	XVII A 9(4)	255	+	+	+	+	-
9	XVII A 9(5)	256	+	+	+	+	-
10	XVII A 12(3)	259	+	+	+	+	+
11	XVII A 15(2)	263	-	+	+	+	+
12	XVII A 21d(3)	267	+	+	+	+	+
13	XVII A 21d(4)	268	+	+	+	+	+

Para determinar presencia o no de co-integración de genes de interés e identificar progenies para la generación T<sub>2</sub>, se generaron las progenies T<sub>1</sub> que se muestran en Tabla 12. Se observa que las líneas con mayor progenie presentaron tolerancia al herbicida Basta, normal para la integración de un loci del gen *bar* (75%). Las líneas con menor progenie (dado a problemas de germinación de semillas) presentaron proporciones levemente distorsionadas de lo esperado, lo que se explica por el reducido tamaño de la progenie que impide tener un valor representativo de las clases a obtener.

**Tabla 12.** Caracterización genética de líneas transgénicas T<sub>1</sub> de la construcción AtPT2-*adh*-MDH co-integrada con la construcción AtPT2-*adh*-PEPC36.

XVII (AtPT2- <i>adh</i> -PEPC36-NOST + AtPT2- <i>adh</i> -MDH-NOST)							FENOTIPO T1																					
Nº	LINEA	AtPT2- <i>adh</i> -PC36-NOST	AtPT2- <i>adh</i> -MDH-NOST	PC36-NOST	MD-NOST	T0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	%	
1	XVII A 9(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	79
2	XVII A 12(2)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	75
3	XVII A 15(1)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	80
4	XVII A 43a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	80
5	XVII A 9(1 1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	80
6	XVII A 15(2)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	86

De acuerdo a los resultados de caracterización molecular, las líneas 1, 3 y 4 no presentarían co-integración de los genes de *L. albus*, en contraste con lo que se observa en la línea 2. Para confirmar la posible co-integración de genes de interés y de selección se desarrolló la generación T<sub>2</sub> mediante autopolinización de las plantas 2 y 12 de la línea 1; 6, 12 y 16 de la línea 2; 2, 14 y 15 de la línea 3, y planta 5 de la línea 4. En la Tabla 13 se aprecia que plantas de las líneas 1, 2 y 4 presentan segregación del gen de selección *bar*, en tanto que la línea 2 planta 16 y línea 3 planta 2 parecieran estar al estado homocigoto para el gen de selección *bar*.

**Tabla 13.** Caracterización genética de líneas transgénicas T<sub>2</sub> de la construcción AtPT2-*adh*-MDH co-integrada con la construcción AtPT2-*adh*-PEPC36.

IAAtPT2- <i>adh</i> -PEPC36-Nost + AtPT2- <i>adh</i> -MDH-Nost							FENOTIPO												SUELO				
Nº	LINEA	CODIGO	AtPT2- <i>adh</i> -NOST	AtPT2- <i>adh</i> -NOST	PC36-	MD-	T1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	
1	XVII A 9(1)2	XVII-1-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	XVII A 9(1)12	XVII-1-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	XVII A 12(2)6	XVII-2-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	XVII A 12(2)12	XVII-2-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	XVII A 12(2)16	XVII-2-16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	XVII A 15(1)2	XVII-3-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	XVII A 15(1)14	XVII-3-14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	XVII A 15(1)15	XVII-3-15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	XVII A 43a-5	XVII-4-5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Para confirmar la posible co-integración del gen de selección con los genes de interés, se analizaron todos los genes, promotores e intrones en las líneas previamente analizadas fenotípicamente en términos de tolerancia al herbicida Basta. De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 14), las líneas 2 y 3, plantas 16 y 2, respectivamente, serían homocigotas para los genes de interés y de selección, y estarían co-segregando. Si bien existen algunas plantas de la progenie de estas líneas con amplificación negativa para algunos fragmentos, estas no presentan una secuencia lógica dado que otros fragmentos de iguales genes o partes de ellos aparecen positivos en las mismas líneas. Como se explicó, este comportamiento podría atribuirse a problemas de calidad del ADN, así como a las reacciones de PCR, entre otros. El resto de las líneas se encuentran aun en estado heterocigoto y sus genes posiblemente no están co-integrados.

**Tabla 14.** Caracterización molecular de líneas transgénicas T<sub>2</sub> de la construcción AtPT2-adh-MDH co-integrada con la construcción AtPT2-adh-PEPC36.

XVII (AtPT2-adh-PEPC36-NOST + AtPT2-adh-MDH-NOST)				PLANTAS T <sub>2</sub>												
Nº	LÍNEA	CÓDIGO	análisis	T1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	XVII A 9(1)12	XVII-1-12	FENOTIPO	+	-	-	+	-	-	-	+	+				
1	XVII A 9(1)12	XVII-1-12	AtPT2-adh-PC36	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
1	XVII A 9(1)12	XVII-1-12	PC36-NOST	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
1	XVII A 9(1)12	XVII-1-12	AtPT2-adh-MDH	+	+	+	+	+	-	+	+	+				
1	XVII A 9(1)12	XVII-1-12	MDH-NOST	+	+	-	+	-	+	+	+	+				
2	XVII A 12(2)16	XVII-2-16	FENOTIPO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	XVII A 12(2)16	XVII-2-16	AtPT2-adh-PC36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	XVII A 12(2)16	XVII-2-16	PC36-NOST	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-		
2	XVII A 12(2)16	XVII-2-16	AtPT2-adh-MDH	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	
2	XVII A 12(2)16	XVII-2-16	MDH-NOST	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-		
3	XVII A 15(1)2	XVII-3-2	FENOTIPO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	XVII A 15(1)2	XVII-3-2	AtPT2-adh-PC36	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+		
3	XVII A 15(1)2	XVII-3-2	PC36-NOST	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-			
3	XVII A 15(1)2	XVII-3-2	AtPT2-adh-MDH	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+		
3	XVII A 15(1)2	XVII-3-2	MDH-NOST	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-		
4	XVII A 43a-5	XVII-4-5	FENOTIPO	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4	XVII A 43a-5	XVII-4-5	AtPT2-adh-PC36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	XVII A 43a-5	XVII-4-5	PC36-NOST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	XVII A 43a-5	XVII-4-5	AtPT2-adh-MDH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	XVII A 43a-5	XVII-4-5	MDH-NOST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

En esta actividad se analizaron genética y molecularmente los segregantes de la construcción AtPT2-adh-MDH co-integrada con AtPT2-adh-PEPC36. Se demostró homocigocis en dos de cuatro líneas estudiadas en la generación T<sub>2</sub>.

### ACTIVIDAD 6.6. Caracterizar fisiológicamente líneas transgénicas T<sub>2</sub>

Esta actividad se realizó en líneas de trigo transgénico previamente caracterizadas genética y molecularmente. Adicionalmente, y con el objetivo de caracterizar fisiológicamente plantas transgénicas que efectivamente expresaran el transgén, la Actividad 6.6. se complementó con estudios de expresión de transcritos mediante PCR en tiempo real (qPCR). En esta sección también se presentan y discuten los resultados de la Actividad 5.7.

**Expresión de transcritos.** Se observó diferencias significativas en la expresión de transcritos transgénicos evaluados mediante qPCR (Figura 9). La mayor expresión PEPC36 ocurrió en el evento XVII A15(1)2 de la transformación en donde se co-integró ambas construcciones (AtPT2-adh-PEPC36 + AtPT2-adh-MDH). En promedio, la expresión MDH en la construcción AtPT2-adh-MDH fue inferior a la que caracterizó a la expresión PEPC en la construcción AtPT2-adh-PEPC36 (Figura 10). En general, y no obstante detectarse presencia del transgen integrado en el genoma (Actividades 5.5, 5.6, 6.4 y 6.5), no se detectó expresión de transcritos en aproximadamente el 40% de las plantas transformadas. El silenciamiento de genes podría explicar este comportamiento.

**Exudación de citrato y malato.** Mediante HPLC se detectó principalmente exudados de malato en líneas de trigo transformadas con las construcciones AtPT2-adh-PEPC36, AtPT2-adh-MDH, y con ambas co-integradas en el genoma de trigo Bobwhite. Los exudados de malato en plantas transformadas fluctuaron entre 23 y 74 nmoles h<sup>-1</sup> planta<sup>-1</sup>. No se detectó exudados de malato en el control Bobwhite no transformado, en plantas control de la construcción AtPT2-adh-PEPC36, así como en 3 de 5 líneas de la construcción AtPT2-adh-MDH. Exudados de citrato fueron evidentes sólo en una línea de la construcción donde se co-integraron ambas construcciones (Figura 11). Estos resultados son inéditos y, como tal, deben corroborarse mediante estudios de cinética de exudados, antes de hacerlos públicos. Solo existe evidencia de incremento de citrato en plantas donde se ha utilizado la enzima citrato sintasa modulada por un promotor constitutivo.

Si bien se logró aumentar o inducir exudados radicales en plantas de trigo transgénico más allá de la meta inicialmente propuesta en este proyecto (10%), las tasas de exudación pueden ser bajas para lograr desorción significativa de P desde el suelo. Adicionalmente, la constante de afinidad del malato por metales a los cuales está retenido el P en suelos ácidos (aluminio y hierro) es inferior a la del citrato, de manera que el malato tiene menor capacidad de desorción de P. En este sentido, resulta interesante la línea 2-6 de Bowwhite donde se co-integraron ambas construcciones, la única en donde se observó exudados de ambos ácidos orgánicos (Figura 11).

**Cuantificación de metabolitos.** Se cuantificó citrato y malato en el tejido radical de trigo transgénico utilizado en la exudación de citrato y malato. En todas las plantas evaluadas se detectó citrato y malato en el tejido radical. La concentración de citrato fluctuó entre 1 y 20  $\mu\text{moles g}^{-1}$  peso fresco, para un promedio de  $4,7 \pm 0,8$  (-P) y  $11,5 \pm 1,7$  (+P) en el control no transformado Bobwhite. A diferencia de la exudación de citrato, estos resultados confirman que la concentración de este ácido orgánico en raíces se incrementa en presencia de P. Entre las plantas transgénicas, existen al menos dos líneas que superaron 5 veces la concentración de citrato respecto del control Bobwhite sin P (15-1 en la construcción AtPT2-adh-PEPC36 y 16-1 en la construcción donde se co-integraron ambos genes) (Figura 11).

La concentración de malato en el tejido radical fluctuó entre 4 y 72  $\mu\text{moles g}^{-1}$  peso fresco, para un promedio de  $7,42 \pm 6,7$  (-P) y  $38,5 \pm 2,5$  (+P) en el control no transformado Bobwhite. Estos resultados indican que el malato se incrementa en mayor proporción que el citrato en tejidos de plantas mantenidas en presencia de P. Esta observación es evidente en la línea 8-10, hermana de las líneas 8-1, 8-3 y 8-4 en la construcción AtPT2-adh-PEPC36, la única homocigota entre todas las evaluadas. Entre las plantas transgénicas, se dispone de al menos seis líneas cuya concentración de malato superó los 20  $\mu\text{moles g}^{-1}$  peso fresco, comparado con 7,42  $\mu\text{moles g}^{-1}$  peso fresco en el control Bobwhite (Figura 11).

De manera similar a lo comentado para exudados radicales, el incremento observado en la concentración de citrato y malato en trigo transgénico utilizando la PEPC modulada por un promotor inducible el novel y, por lo tanto, los resultados requieren ser corroborados. Solo existe evidencia de incremento de citrato en plantas donde se ha utilizado la enzima citrato sintasa modulada por un promotor constitutivo.

**Capacidad para utilizar fosfatos desde fuentes de P de baja solubilidad.** Se realizaron ensayos preliminares en vermiculita utilizando trigo Bobwhite no transformado. La vermiculita se fertilizó con  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$  y  $\text{CaPO}_4$  como fuentes de P de baja solubilidad, comparados con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , en dosis de 0 y 40 mg P  $\text{kg}^{-1}$  de vermiculita. En estos tratamientos, la fertilización con P incrementó significativamente tanto la fitomasa aérea como la absorción de P en todas las fuentes de P, excepto  $\text{CaPO}_4$  (Figuras 12 y 13). Considerando que la vermiculita es un sustrato inerte, estos resultados indican que la absorción de P desde fuentes de baja solubilidad por trigo Bobwhite pudo estar asociado a P soluble presente como contaminante. En efecto, se demostró la presencia de al menos 0,06, 2 y 2,5 mM de P soluble cuando se utilizaron  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{CaPO}_4$  y  $\text{FePO}_4$  como fertilizantes, respectivamente, posterior incluso a 20 lavados con agua destilada (Figura 14). En consecuencia, la vermiculita fertilizada con fuentes de P utilizadas no es un sustrato apropiado para analizar la capacidad de plantas transformadas para utilizar fuentes de P de baja solubilidad. La excepción correspondió al  $\text{CaPO}_4$ , probablemente asociado al hecho que el P unido a Ca es movilizado sólo en condiciones de pH más básicos que los utilizados en este experimento (pH 5,8).

Adicionalmente, se realizaron ensayos preliminares para evaluar la capacidad de trigo de establecerse y crecer en suelos bajos en P disponible (4 ppm), utilizando dosis de P equivalentes a 0, 20, 40 y 80 mg  $\text{kg}^{-1}$  de suelo. En estos ensayos, la fitomasa aérea se incrementó sostenidamente hasta la mayor dosis evaluada (Figura 15). Esto indica que incluso 80 ppm de P agregado fue insuficiente para suplementar las necesidades de P del trigo. En este suelo, la concentración de P soluble en el tejido aéreo solo se elevó desde 1 a 1,8  $\mu\text{moles Pi g}^{-1}$  peso fresco, al aumentar la dosis de P desde 0 a 80 ppm (Figura 15). Como referencia, 40 ppm de P en el suelo es suficiente para alcanzar los máximos rendimientos de trigo en siembras comerciales, sugiriendo que el suelo utilizado se caracteriza por altísima tasa de fijación de P.

Considerando la escasa disponibilidad de semilla  $T_2$ , el comportamiento de plantas transgénicas se evaluó en ausencia de P, en un suelo con 4 ppm de P inicial. En este suelo, las plantas comenzaron a manifestar síntomas de deficiencia de P aproximadamente a los 30 días después de la siembra, sin diferencias evidentes con el control Bobwhite no transformado (Figura 15). Evaluaciones realizadas cercanas a la cosecha (grano en madurez fisiológica), evidenciaron diferencias significativas en la altura promedio de plantas (Figuras 16, 17, 18 y 19). Entre éstas destacan las líneas VII8-10 y XVII12-16, que

coinciden con aquellas con tasas de exudación de malato superior a 40 nmoles h<sup>-1</sup> planta<sup>-1</sup>, en la Figura 11 (VII8-10 y XVII12-16 corresponden a la misma progenie de las líneas 10-5 y 16-1 en la Figura 10, respectivamente). Como se indicó en la Actividad 6.3., ambas líneas no están al estado homocigoto. Estas plantas no se cosecharon con el objetivo de disponer de semilla para evaluar la próxima generación.

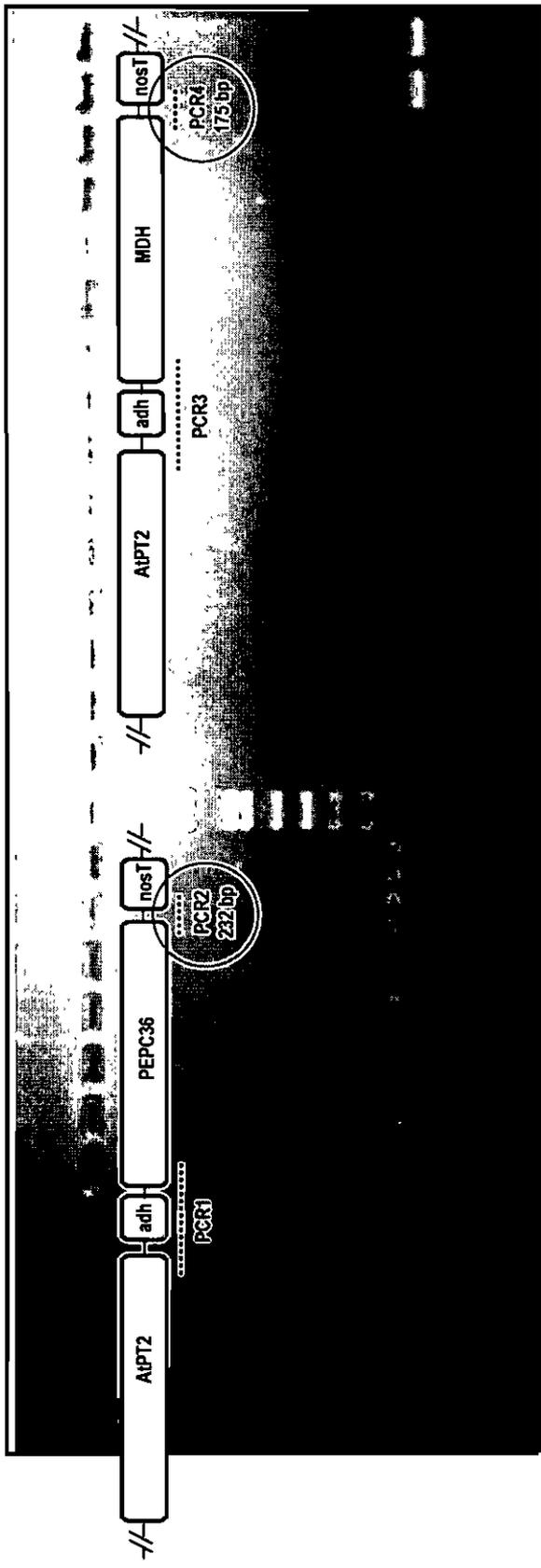
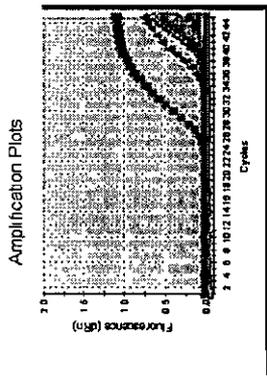
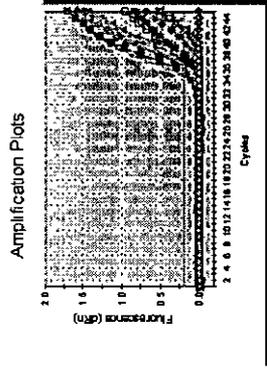
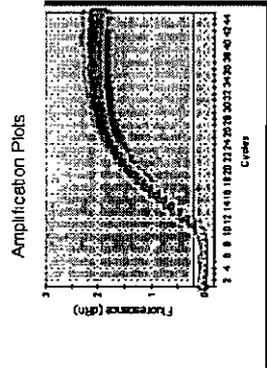
No obstante el impacto logrado en este proyecto en términos de incrementar significativamente la exudación particularmente de malato respecto del control no transformado, los relativamente bajos niveles de exudados sugieren que éstos no serían suficientes para provocar desorción significativa de P desde este suelo. Sin embargo, el comportamiento de bajos niveles de exudados pudiera tener efectos sobre la desorción de P con plantas establecidas en comunidad, donde la mayor masa radical se traduciría en mayores de tasas de exudación por unidad de superficie, comparado con lo que sucede en maceteros. Independiente de estas consideraciones, y aceptando la necesidad de corroborar estos resultados inéditos, la información hasta ahora disponible demuestra la funcionalidad de la estrategia inicialmente planteada en este proyecto. Esta estrategia se puede complementar con la incorporación de otros genes que favorezcan tanto la exudación de los ácidos orgánicos acumulados en raíces, como la absorción de P desde el suelo.

*En esta actividad se demostró que las plantas de trigo Bobwhite transgénicas acumulan y exudan ácidos orgánicos a través de sus raíces, en proporción significativamente superior al control no transformado. Aun cuando requieren ser replicados antes de hacerlos públicos por su condición de inéditos, estos resultados demuestran la funcionalidad de la estrategia inicialmente planteada en este proyecto.*

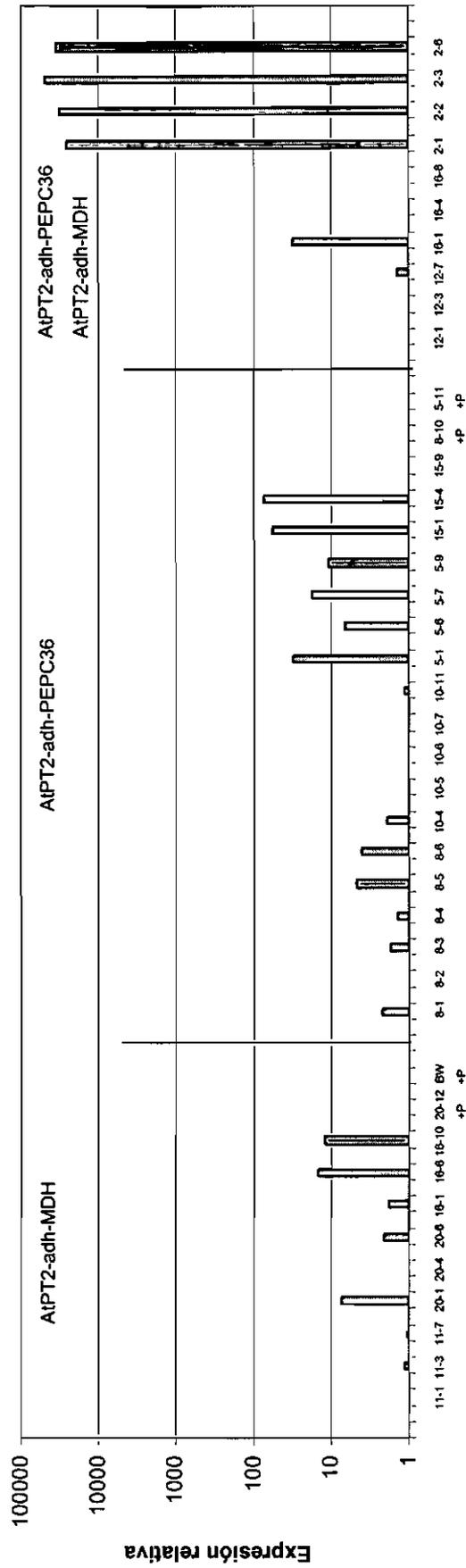
26SrRNA

MDH

PEPC36

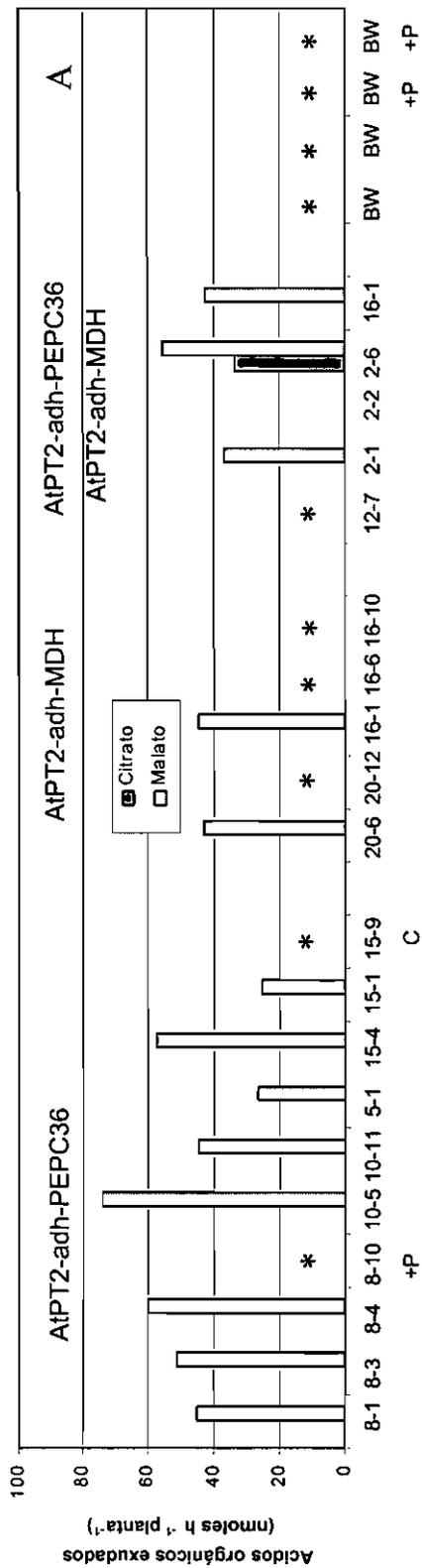


**Figura 9.** Expresión de transcritos PEPC y MDH en ARN obtenido de líneas transgénicas, evaluado mediante PCR en tiempo real. En la parte superior se muestra la amplificación del control interno (gen ribosomal 26S), comparado con la amplificación de diversas líneas transgénicas. Nótese la baja expresión de transcritos observada en líneas transgénicas, excepto cuatro líneas cuya expresión PEPC es significativamente superior. Las amplificaciones por qPCR se verificaron mediante geles de agarosa, donde se observa el amplificado de tamaño esperado (foto inferior). En la foto inferior también se grafican las construcciones con la ubicación de los tamaños amplificados por PCR, realizados para confirmar la presencia de la construcción génica completa. Encerrado en el círculo se indica el fragmento PCR en el cual se analizó la expresión de transcritos.

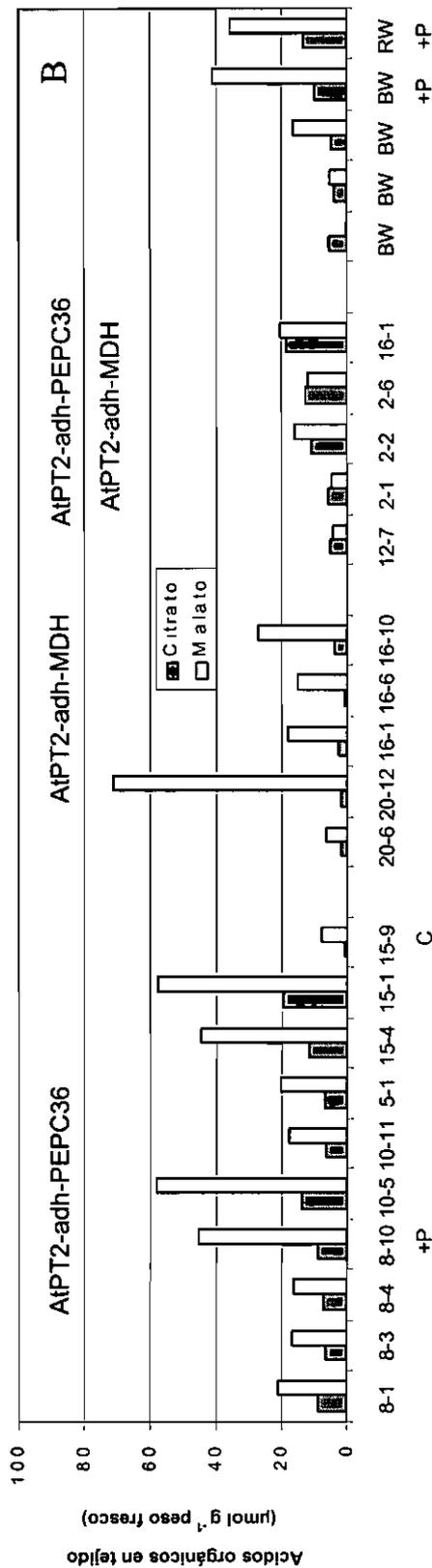


Líneas de trigo transgénico

Figura 10. Expresión de transcritos en líneas transgénicas con las construcciones AtPT2-adh-MDH, AtPT2-adh-PEPC36, y con ambas co-integradas en el genoma de trigo Bobwhite. La expresión se evaluó mediante PCR en tiempo real, y se expresa relativo a la línea transgénica de menor expresión. BW: control Bobwhite no transformado; +P: expresión analizada en presencia de 0,1 mM P.

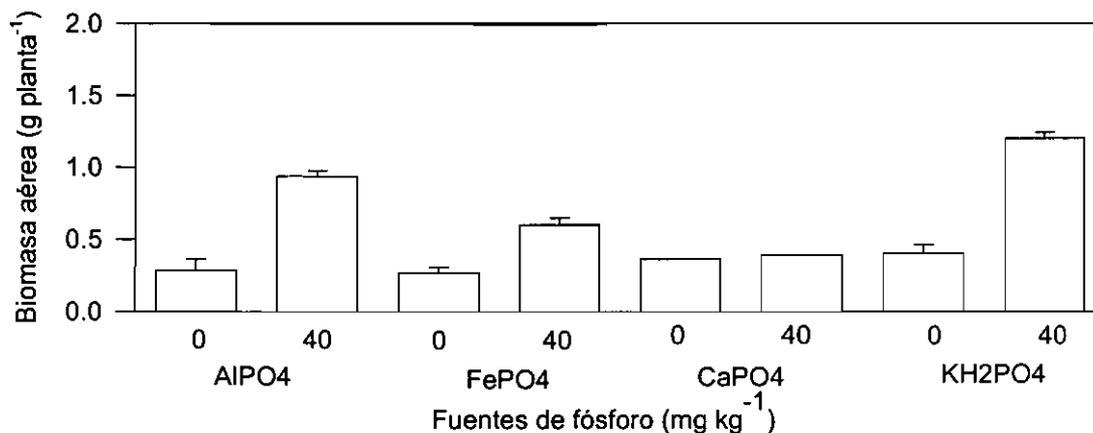


**Líneas de trigo transgénico**

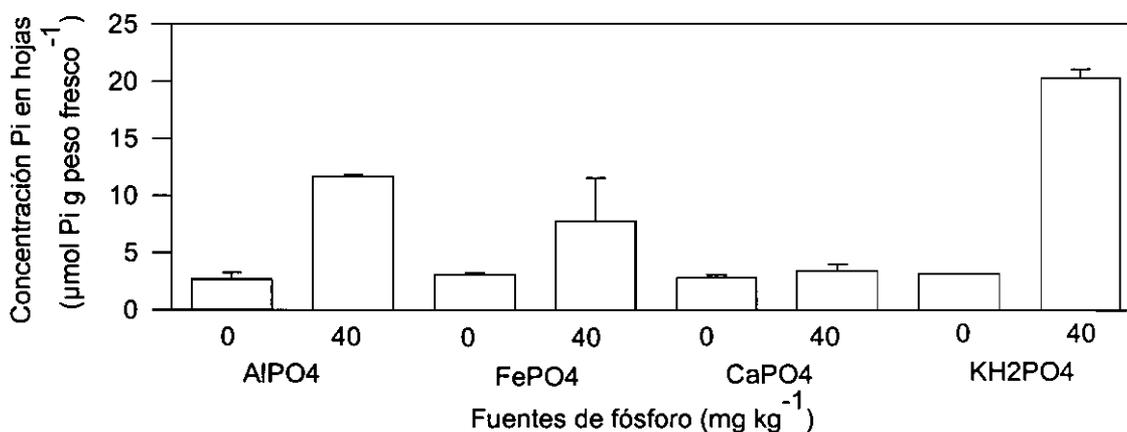


**Líneas de trigo transgénico**

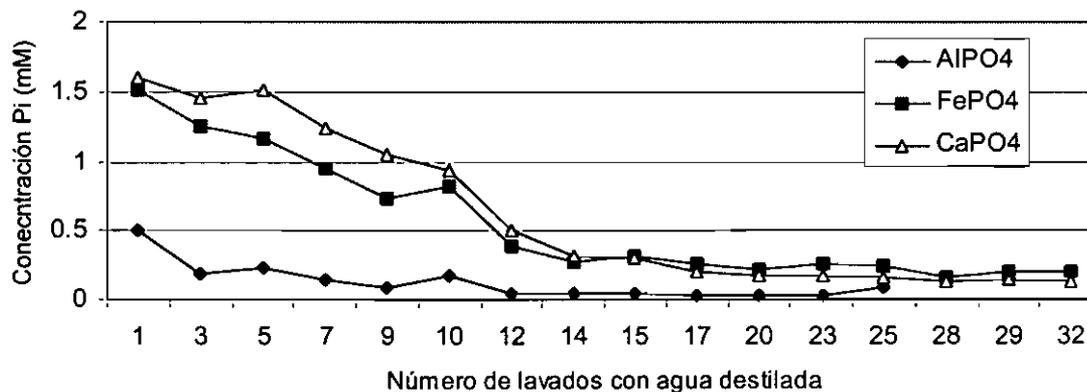
**Figura 11.** Exudación de citrato y malato (A) y concentración de citrato y malato (B) en raíces de trigo transgénico cv. Bobwhite mantenido en ausencia de fósforo. Los valores corresponden a líneas de la generación T<sub>2</sub> transformadas con las construcciones A1PT2-adh-PEPC36 y A1PT2-adh-MDH individualmente, y co-integradas en el genoma de trigo Bobwhite. BW: Bobwhite no transformado, +P: planta mantenida en presencia de 0,1 mM P, C: control transformado, sin expresión de transcritos, \*: no detectado.



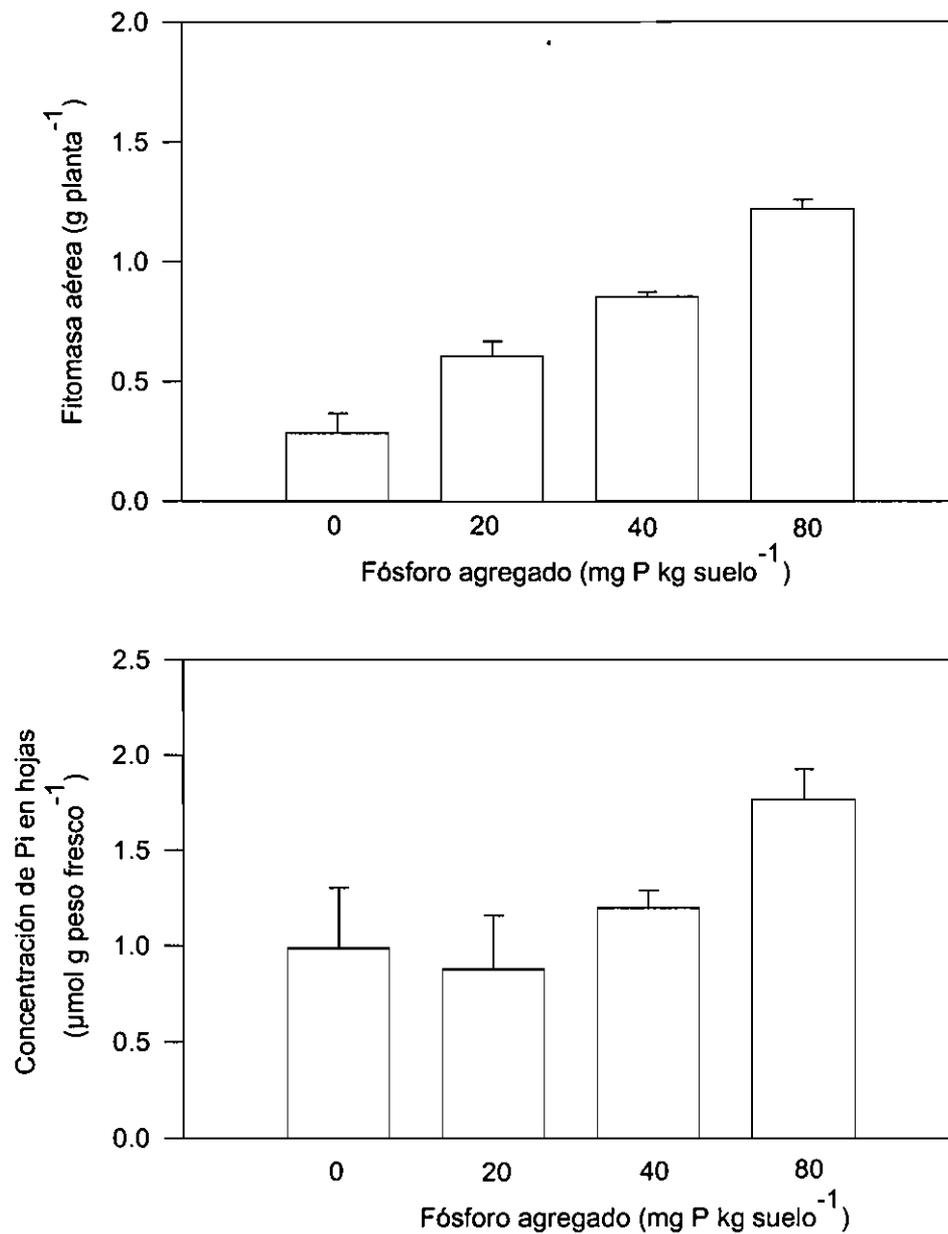
**Figura 12.** Fitomasa aérea de trigo cv. Bobwhite establecido en vermiculita con cuatro fuentes de fósforo aplicadas en dosis de 0 y 40 mg kg<sup>-1</sup>



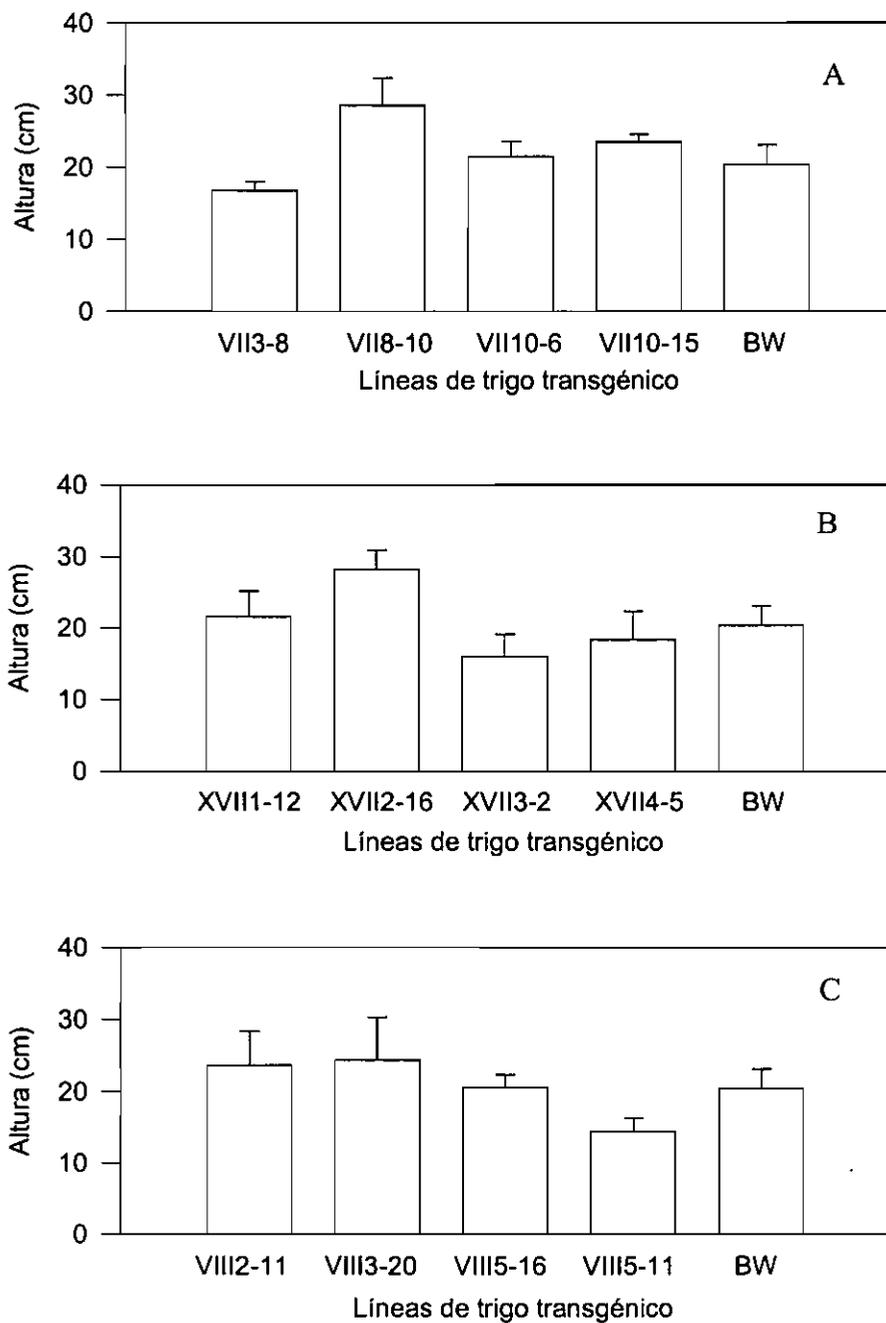
**Figura 13.** Concentración de fósforo inorgánico (Pi) en hojas de trigo cv. Bobwhite establecido en vermiculita con cuatro fuentes de fósforo aplicadas en dosis de 0 y 40 mg kg<sup>-1</sup>



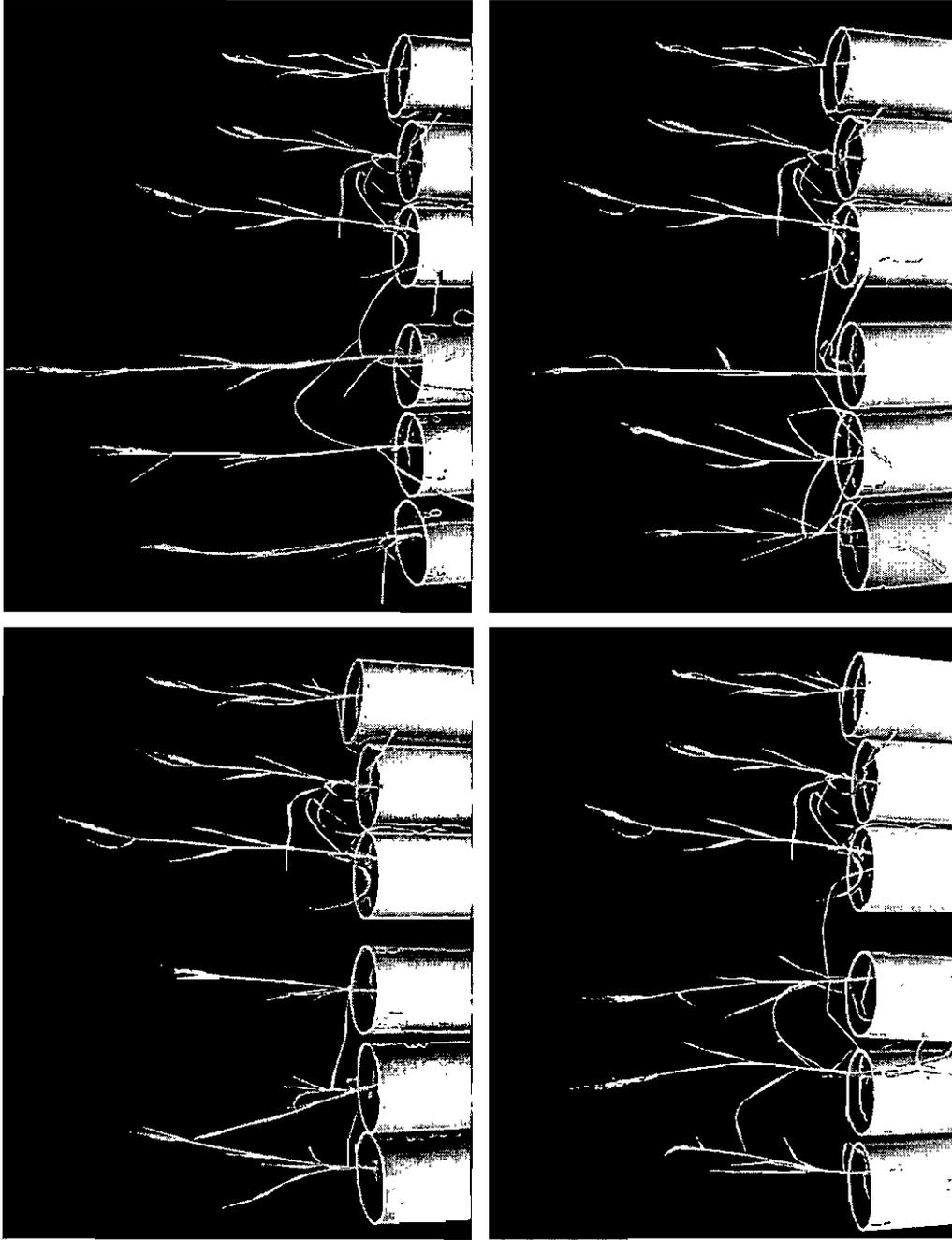
**Figura 14.** Evolución de la concentración de fósforo inorgánico (Pi) soluble presente en tres fuentes de fósforo de baja solubilidad, posterior a sucesivos lavados.



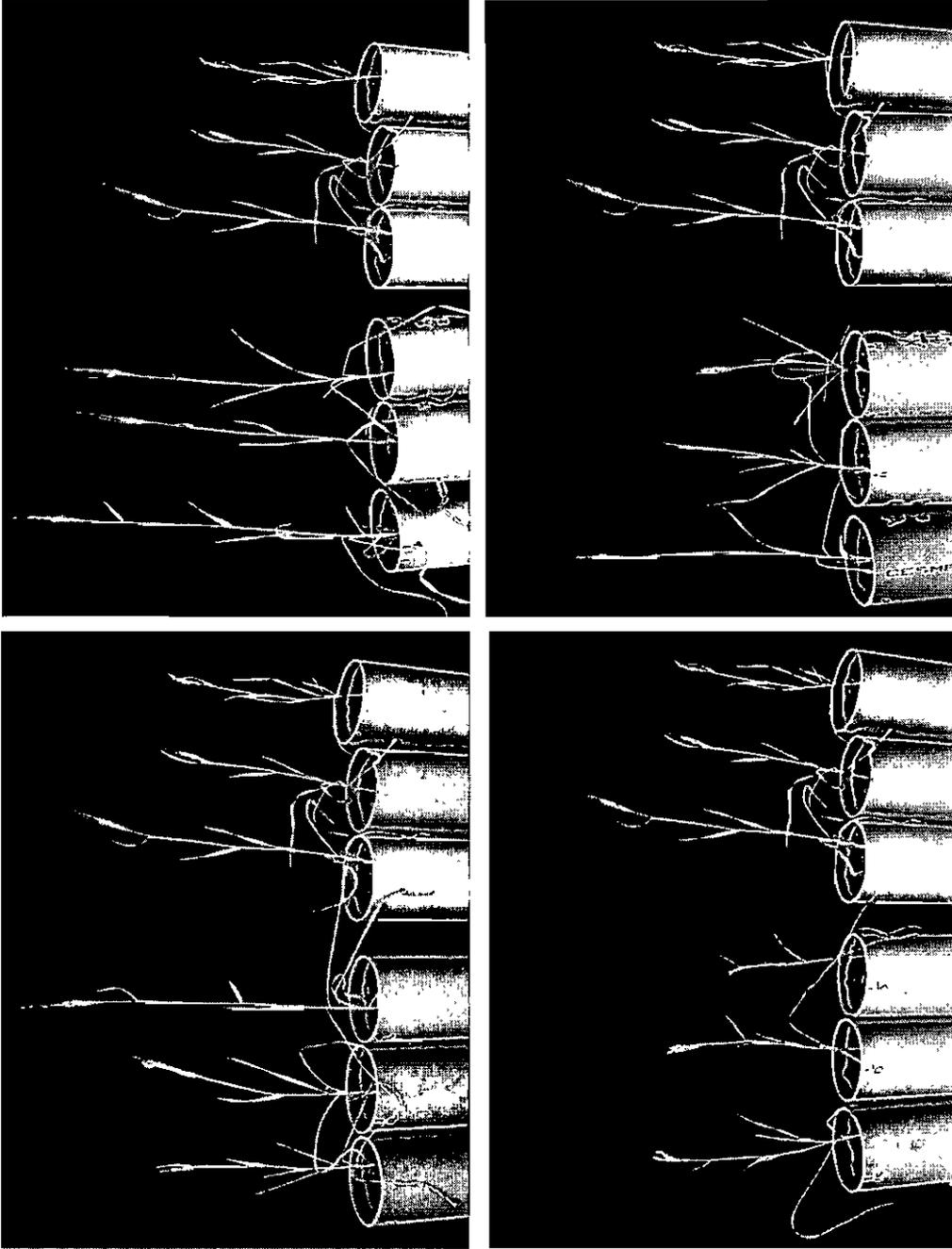
**Figura 15.** Fitomasa aérea (A) y concentración de fósforo inorgánico en hojas(B) de trigo Bobwhite fertilizado con dosis creciente de fósforo. Las plantas se establecieron en un suelo con 4 ppm P inicial.



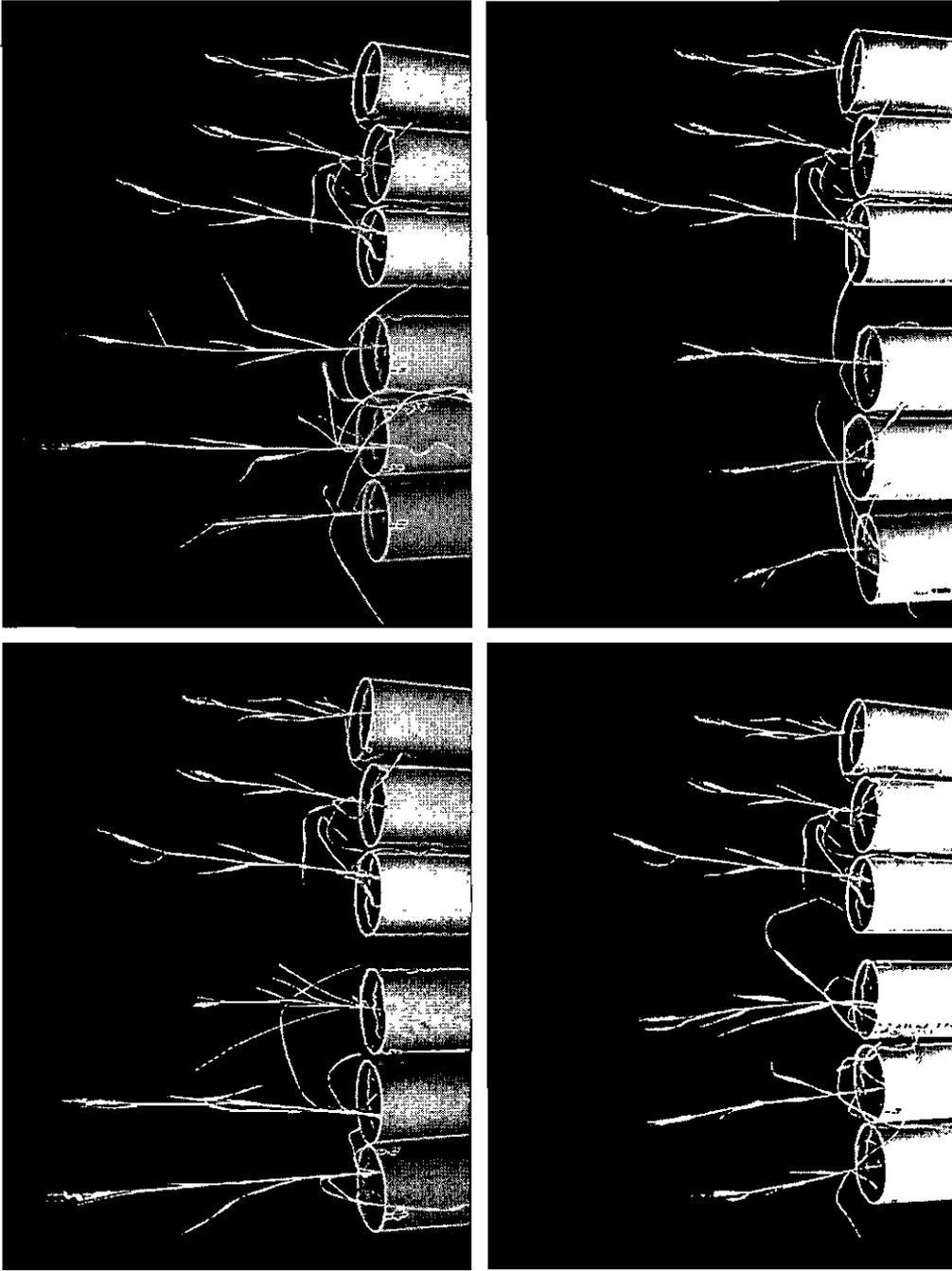
**Figura 16.** Variación en la altura promedio de plantas de trigo transformado con las construcciones AtPT2-adh-PEPC36 (A), AtPT2-adh-PEPC36 + AtPT2-adh-MDH (B) y AtPT2-adh-MDH (C). Las plantas se establecieron en un suelo con 4 ppm de P inicial, sin adición de P. La altura se evaluó al estado de madurez fisiológica del grano. BW: control Bobwhite no transformado.



**Figura 17.** Plantas de trigo bobwhite transformado con la construcción AtPT2-adh-PEPC36, en estado de madurez fisiológica. Cada cuadro representa un evento independiente con tres repeticiones, de las cuatro líneas cuya altura se indica en la Figura 16. Las plantas se establecieron en un suelo con 4 ppm de P inicial. En cada cuadro, las tres plantas de la izquierda corresponden a la línea transgénica, en tanto que las tres plantas de la derecha corresponden al control Bobwhite sin transformar.



**Figura 18.** Plantas de trigo bobwhite transformado con la construcción APT2-adh-PEPC36 + APT2-adh MDH, en estado de madurez fisiológica. Cada cuadro representa un evento independiente con tres repeticiones, de las cuatro líneas cuya altura de plantas se indica en la Figura 16. Las plantas se establecieron en un suelo con 4 ppm de P inicial. En cada cuadro, las tres plantas de la izquierda corresponden a la línea transgénica, en tanto que las tres plantas de la derecha corresponden al control Bobwhite sin transformar.



**Figura 19.** Plantas de trigo Bobwhite transformado con la construcción AtPT2-adh-MDH, en estado de madurez fisiológica. Cada cuadro representa un evento independiente con tres repeticiones, de las cuatro líneas cuya altura de plantas se indica en la Figura 16. Las plantas se establecieron en un suelo con 4 ppm de P inicial. En cada cuadro, las tres plantas de la izquierda corresponden a la línea transgénica, en tanto que las tres plantas de la derecha corresponden al control Bobwhite sin transformar.

## 5. FICHAS TÉCNICAS Y ANÁLISIS ECONOMICO

Si bien se demostró que las plantas de trigo transgénico exudan ácidos orgánicos (principalmente malato) a través de sus raíces, no se dispone de información que permita estimar el impacto de las tasas de exudación sobre la desorción de fósforo en el suelo. En consecuencia, no es factible realizar un análisis económico comparativo respecto del que se presentó inicialmente en esta propuesta.

De confirmarse las tasas de exudación informadas, el resultado final de este proyecto (exudación de ácidos orgánicos en plantas transgénicas significativamente superior al testigo no transformado), se demostraría que la estrategia de expresión de genes asociados a la síntesis y acumulación de ácidos orgánicos (PEPC y MDH) modulada por un promotor inducible por la deficiencia de fosfato, es factible en trigos. Este resultado es inédito y, de confirmarse, se podría extender a otras especies de interés comercial cuyo cultivo se desarrolla en suelos ácidos.

Como consecuencia de lo anterior, y considerando que en la literatura no existe evidencia de la utilización del gen PEPC como transgén modulado por un promotor inducible para inducir la síntesis de ácidos orgánicos, la estrategia sería patentable.

## 6. IMPACTOS Y LOGROS DEL PROYECTO

### Impactos tecnológicos

Consolidación de la Unidad de Biotecnología de INIA Carillanca como un laboratorio relevante en el área de la biotecnología de plantas en el país, considerando que esta línea de investigación se inició con la ejecución del proyecto BIOT-01-A-36.

Establecimiento de un eficiente proceso de transformación genética de cultivares de trigo chilenos. Esta tecnología está disponible a eventuales interesados.

Propiedad de una biblioteca de expresión, específica de tejidos (raicillas proteoideas de *L. albus*) que exudan ácidos orgánicos (citrate) en respuesta a la deficiencia de fósforo. Esta biblioteca tiene un enorme potencial para identificar y aislar la región codificante de virtualmente todos los genes que se expresan en respuesta a la deficiencia de fósforo en *L. albus*.

Treinta ESTs de *L. albus* clonadas y secuenciadas, potencialmente utilizables como sondas para el aislamiento de genes que se expresan o reprimen en respuesta a la deficiencia de fósforo en plantas.

Región codificante completa de siete genes que se expresan en condiciones de ausencia de fósforo en plantas, con potencial para ser utilizados en trigo u otros cultivos.

Dos promotores de largo completo de Arabidopsis (AtPT1 y AtPT2) y un promotor parcial de trigo (TaPT2), todos funcionales, clonados y secuenciados.

Siete construcciones génicas, potencialmente utilizables en otras especies de interés comercial.

Semilla T<sub>2</sub> de trigo Bobwhite transgénico que exudan malato en ausencia de fósforo. De confirmarse esta característica en plantas homocigotas, se puede transferir a cultivares de trigo de interés comercial simplemente mediante retrocruzamientos.

## Impactos científicos

Una publicación ISI.

Trece presentaciones a Congresos, de las cuales cuatro correspondieron a presentaciones orales.

Inscripción de tres genes PEPC en el GenBank.

Establecimiento de relaciones con dos connotados investigadores tanto en disciplinas de transformación de monocotiledóneas (Dr. A. Pellegrineschi), como en biología molecular aplicada al mejoramiento de la adaptación de las plantas a suelos ácidos (Dr. M. Delhaize).

Desarrollo de una estrategia transgénica potencialmente patentable, basada en la utilización de promotores de transportadores de fosfato de alta afinidad, para dirigir la expresión de genes modulada por la disponibilidad de fósforo en el suelo.

## 7. PROBLEMAS ENFRENTADOS DURANTE EL PROYECTO

**De gestión.** La ejecución del proyecto no se afectó por problemas atribuibles a gestión.

**Técnicos.** Se presentaron problemas principalmente durante el desarrollo de las actividades relacionadas con el aislamiento de promotores y el ensamble de las construcciones génicas. Estos problemas son propios de la investigación y se resolvieron sólo con más tiempo de dedicación, lo que finalmente se tradujo en extensiones respecto a los tiempos inicialmente programados. Sin embargo, esta extensión no fue suficiente para realizar dos experimentos que, sin afectar el objetivo central del proyecto (demostrar que plantas de trigo transgénico acumulan y exudan ácidos orgánicos), se estiman muy relevantes para confirmar los resultados. Estos experimentos se refieren a la cuantificación de actividad PEPC y a la evaluación de plantas transgénicas en respuesta a aluminio fitotóxico. Considerando el monto no utilizado de \$ 2.156.607, y de acuerdo a lo estipulado en el Convenio, se espera su re-integro a la Unidad Ejecutora con el objetivo de realizar estos experimentos inconclusos.

**Administrativos.** No hubo problemas de esta naturaleza.

**Legales.** No hubo problemas de esta naturaleza

## 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La ejecución de este proyecto permitió desarrollar plantas de trigo transgénico que exudan ácidos orgánicos en cantidades superiores a trigo no transformado. Sin embargo, las tasas de exudación son probablemente insuficientes para provocar desorción significativa de fósforo desde el suelo, al menos en plantas individuales establecidas en maceteros.

Considerando que la estrategia utilizada para lograr aumentar las tasas de exudación de ácidos orgánicos es inédita, su propiedad intelectual debiera ser protegida. Paralelamente, se debiera identificar fuentes de financiamiento para continuar perfeccionando la estrategia a través de la introducción de nuevos genes, y eventualmente evaluarla en otros cultivos de interés comercial.

## IV. INFORME DE DIFUSIÓN

### a) Eventos realizados

Durante Septiembre de 2003 se recibió la visita del Dr. Alessandro Pellegrineschi (CIMMYT, Mexico). El Dr. Pellegrineschi es especialista en transformación de trigos, y su visita se enmarcó dentro de las actividades programadas en el proyecto. Durante su estadía de 4 días en Temuco, se discutieron aspectos relevantes a la transformación de plantas que se está realizando en Carillanca, así como a su futura colaboración en éste u otros proyectos vinculados a trigo. El Dr. Pellegrineschi presentó el Seminario: "Efficient wheat transformation and proving concepts in transgenic wheat", el que se realizó en el CRI Carillanca con una asistencia de 16 profesionales y técnicos.

En Septiembre 28 de 2005 se realizó la actividad "Biotecnologías y Transgenia en Plantas", dirigida a estudiantes de educación media. Esta actividad se realizó durante todo el día en el auditorium de INIA Carillanca, y constó de una parte teórica y práctica sobre principios básicos de la biología molecular, para luego explicar el proyecto "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". Asistieron 300 alumnos de 3° y 4° medio de 10 colegios de la región, divididos en tres grupos. Los colegios participantes de esta actividad fueron: Liceos Agrícola de Cajón, Chol-Chol y Traiguen, Liceo Puquereo de Villarrica, Liceo La Providencia de Temuco, Liceo Agrícola San Sebastián de Temuco, Colegio Alemán de Temuco, Colegio Santa Cruz de Villarrica, y Complejo Educacional Martín Kleinknecht de Temuco,

Durante Noviembre de 2006 se recibió la visita del Dr. Manny Delhaize (SCIRO, Australia). El Dr. Delhaize tiene una amplia trayectoria en el mejoramiento de plantas a suelos ácidos desde una perspectiva molecular. Durante su visita se realizaron reuniones para discutir nuestro proyecto y la factibilidad de realizar trabajos conjuntos. Manny Delhaize realizó dos presentaciones en el marco de su visita, las que se indican a continuación:

Delhaize M. Plant adaptation to acid soils; strategies, challenges and opportunities. Simposio "Adaptación de las plantas a suelos ácidos; mecanismos y estrategias moleculares de mejoramiento". XLIX Reunión Annual de la Sociedad de Biología de Chile. Noviembre 23 de 2006. Pucón

Delhaize M. Genetic solutions for acids and phosphorus-deficient soils. MiniSimposio "Estrategias moleculares para el mejoramiento de la adaptación de las plantas a suelos ácidos". Noviembre 24 de 2006, INIA Carillanca, Temuco

Con el patrocinio de la Sociedad de Botánica de Chile y la Fundación para la Innovación Agraria, en Noviembre de 2005 se realizó el Simposio "Adaptación de las plantas a suelos ácidos, mecanismos y estrategias moleculares de mejoramiento". Este evento se presentó en la XLIX Reunión Annual de la Sociedad de Biología de Chile y constó de cinco expositores:

Pinochet D. Suelos ácidos de Chile, causas y consecuencias de su acidificación.

Peñaloza E. Estrategias biotecnológicas para mejorar la adaptación de las plantas a la deficiencia de fósforo en suelos ácidos.

Mora ML. Mecanismos de tolerancia de las plantas al exceso de manganeso en los suelos del sur de Chile.

Salvo H. Mapeo e introgresión de genes que confieren tolerancia a aluminio fitotóxico en cereales.

Delhaize M. Plant adaptation to acid soils; strategies, challenges and opportunities.

En el marco de las actividades de difusión contempladas en el proyecto, en Noviembre de 2006 se realizó el Seminario "Estrategias moleculares para el mejoramiento de la adaptación de las plantas a suelos ácidos". El evento tuvo lugar en el CRI Carillanca con la participación de 32 personas entre académicos y estudiantes de post-grado de las Universidades de la región y profesionales de INIA Carillanca, y en él se presentaron los siguientes temas:

Peñaloza E. Genes de lupino en el genoma del trigo, con potencial para movilizar el fósforo inorgánico retenido en suelos ácidos.

Delhaize M. Genetic solutions for acid and phosphorus-deficient soils.

## **b) Presentaciones a Congresos y Seminarios**

### **Presentaciones en forma de panel (se adjuntan)**

Unidad de Biotecnología, INIA Carillanca. 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. Seminario Biotecnología, Proyectos de investigación y desarrollo en biotecnología silvoagropecuarias: situación actual chilena. Julio 18 y 19 de 2002. CEPAL, Santiago.

Peñaloza E, Muñoz G, Salvo-Garrido H. Expresión y actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa en raíces proteoideas de lupino blanco deficiente en fosfatos. XLV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. Puyehue, 12 al 16 de noviembre de 2002. Panel

Milla L, Tittarelli A, Salas C, Silva H. Obtención de promotores raíz-específicos, regulados negativamente por fósforo en *Triticum aestivum* y *Arabidopsis thaliana*. XLV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. Noviembre de 2002, Puyehue.

Peñaloza E, Muñoz G, Salvo-Garrido H, Silva H, Corcuera LJ. Tres isoformas fosfoenolpiruvato carboxilasa en raíces proteoideas de lupino blanco diferencialmente reguladas por fosfatos. Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. Noviembre de 2003, Puyehue.

Unidad de Biotecnología, INIA Carillanca. Integration of lupin genes into wheat genome with the ability to exudate organic acids and release P from volcanic soils. Global Forum in Biotechnology. Marzo de 2004, Concepción.

Peñaloza E, Muñoz G, Salvo-Garrido H, Silva H, Corcuera L, Campillo R. Integración de genes de lupino en trigo, con potencial para movilizar el fósforo inorgánico retenido en los suelos del centro-sur y sur de Chile. SEMBIOTEC 2005, El sector agrícola y la biotecnología: situación actual y desafíos. Santiago, Noviembre de 2005

Peñaloza E, Muñoz G, Salvo-Garrido H, Corcuera LJ. Raíces proteoideas de *Lupinus albus* como modelo para aislar genes asociados con la adaptación de las plantas a la deficiencia de fósforo. Congreso RedBio, Junio de 2005, Buenos Aires, Argentina.

Salvo-Garrido H, Peñaloza E, Muñoz G, Milla L, Neupert C, Silva H. Evaluación de la funcionalidad de promotores de transportadores de fosfato de alta afinidad para dirigir la expresión de genes en trigo. Congreso REDBIO, Junio de 2005, Buenos Aires, Argentina.

Espejel F, Peñaloza E, Salvo-G H, Muñoz G, Silva H, Neupert C, Milla L, Campillo R, Corcuera JL. Expresión heteróloga de promotores de transportadores de fosfato de alta afinidad en trigo sometido a diferentes concentraciones de fosfato. XLIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. Noviembre de 2006, Pucón,

### **Presentaciones Orales**

Peñaloza E. Integration of lupin genes into wheat genome with potential to mobilize inorganic phosphate from soils of southern Chile. Road Show del Global Forum in Biotechnology. Marzo de 2004, Concepción.

Peñaloza E. Integración de genes de lupino en trigo, con potencial para movilizar el fósforo inorgánico retenido en los suelos del centro-sur y sur de Chile. SEMBIOTEC 2005, El sector agrícola y la biotecnología: situación actual y desafíos. Noviembre de 2005, Santiago

Peñaloza E. Estrategias biotecnológicas para mejorar la adaptación de las plantas a la deficiencia de fósforo en suelos ácidos. Simposio "Adaptación de las plantas a suelos ácidos; mecanismos y estrategias moleculares de mejoramiento". XLIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. Noviembre de 2006. Pucón.

Peñaloza E. Genes de lupino en el genoma de trigo, con potencial para movilizar el fósforo inorgánico retenido en suelos ácidos. MiniSimposio "Estrategias moleculares para el mejoramiento de la adaptación de las plantas a suelos ácidos". Noviembre 24 de 2006, INIA Carillanca, Temuco.

### **c) Publicaciones (se adjunta)**

Peñaloza E, Muñoz G, Salvo-Garrido H, Silva H, Corcuera LJ. 2005. Phosphate deficiency regulates phosphoenolpyruvate carboxylase expresión in proteoid root clusters of white lupin. J. Exp. Botany 409: 145-153.

## **V. ANEXOS**

Los anexos se adjuntan en las siguientes hojas. Estos incluye lista de participantes en el proyecto, programas de eventos de difusión, notas de prensa, poster de presentaciones y artículo ISI.

## Participantes

<b>Nombre Completo y Firma</b>	<b>RUT</b>	<b>Profesión</b>	<b>Especialidad</b>	<b>Función y Actividad en el Proyecto</b>	<b>Dedicación al Proyecto (%/año)</b>
Enrique Peñaloza H.	6.864.703-7	Ing. Agrónomo	Fisiología molecular	Coordinador Aislamiento y caracterización genes; caracterización fisiol. qPCR	50%
Gastón Muñoz V.	9.326.546-7	Bioquímico	Biología molecular	Coordinador alternativo Construcción de vectores y genoteca, PCR, secuenciación	30%
Haroldo Salvo G.	10.256.252-6	Ing. Agrónomo	Genética molecular y transgenia	Transformación de trigo y caracterizac. genético-molecular	25%
Herman Silva A.	8.541.928-5	Bioquímico	Biología molecular y transgenia	Aislamiento y caracterización de promotores	10%
Luis J. Corcuera P.	5.170.015-5	Profesor	Fisiología vegetal	Caract. fisiológica (fotosíntesis) de plantas transgénicas	5%
Ricardo Campillo R.	6.037.863-0	Ing. Agrónomo	Fertilidad de suelos	Caracterización nutricional de plantas transgénicas	5%
Paola Rathgeb F.	12.532.626-9	Ing. Ejec. Agríc.	Biología molecular	Apoyo en técnicas de biología molecular	30%
Lorena Díaz A.	8.997.507-7	Téc. Univ. en. Prod. Agrícola.	Cultivo de tejidos	Apoyo en transgénesis y regeneración de plantas	50%
Marely Cuba		Bióloga	Biología molecular	Diseño de construcciones, PCR y RT-PCR	100%
Fulgencio Espejel		Biólogo	Biología molecular	Diseño de construcciones, PCR y qPCR	100%

CADA AÑO SE PIERDEN MAS DE 20 MILLONES DE DOLARES EN LA REGION

# “Estamos en una mina de fósforo”

● Cientos de alumnos conocieron Inia Carillanca y sus proyectos científicos más importantes

Andrés y sus compañeros estaban fascinados. El y sus compañeros escuchaban al investigador exponer, en la forma más sencilla posible, algunos de los proyectos de investigación más importantes del centro Inia Carillanca.

“No pensé que era tan importante esto que hacen acá”, dijo un joven proveniente del Liceo Agrícola de Angol. “Ojalá puedan recuperar los suelos de la región, porque eso sería muy bueno para mucha, mucha gente”, agregó Natascha de 16 años, que lo acompañaba.

La jornada de Casa Abierta, realizada anualmente por el centro Inia Carillanca, se realizó en medio de un gran alboroto infantil que irrumpió por un día en medio del frío ambiente científico que se respira en los pasillos del centro.

## INVESTIGACION

Y es que los jóvenes tenían muchos motivos para sentirse sorprendidos. Destacados profesionales les explicaron, con cuidado y paciencia, aspectos generales de la investigación agrícola que se realiza allí, en especial uno de sus temas estrella: la investigación genética.

En este sentido, pudimos conocer uno de los proyectos más interesantes llevados a cabo en el centro: la posibilidad de su-

La Casa Abierta atrajo a cientos de niños de los liceos agrícolas de Cajón, Chol Chol, Traiguén, Perquenco, Villarrica, Angol y Temuco.



perar, al menos en parte, el problema de los suelos ácidos que retienen grandes cantidades de nutrientes, sin permitir a las plantas hacer uso de ellos.

## FOSFORO

El tema del fósforo es uno de los más graves, dice el doctor Enrique Peñaloza, investigador del centro Carillanca.

**Experimento**  
Se estudia la posibilidad que el trigo absorba mayor fósforo desde el suelo mediante su asimilación con el lupino.

Se calcula que cada año, La Araucanía pierde unos 20 millones de dólares en fósforo que se aplica al suelo sin poder usarlo. “Estamos sobre una mina de fósforo”, dice el científico.

El motivo es que las grandes cantidades de aluminio y fierro

que contienen los suelos de La Araucanía, retienen un altísimo porcentaje del fósforo que se proporciona a las plantas para su crecimiento. El trigo, el principal cultivo de nuestra región, es el perjudicado. Sencillamente no puede captar sino cantidades insignificantes de fósforo del suelo para su crecimiento, lo que repercute en su rentabilidad.

En tanto, cada año, enormes cantidades de fósforo se siguen acumulando en las profundidades de nuestro suelo “con el peligro de provocar todo tipo de trastornos ambientales, como la eutricación de los lagos y los ríos, contaminados a través de las napas freáticas por ejemplo. Usted ve como están de llenos de algas la mayoría de los ríos de la región y eso se debe, en gran parte, a la inmensa cantidad de fósforo que se ha aplicado durante años sobre el suelo de la región”, dice Peñaloza.



Enrique Peñaloza, impulsor de un crucial proyecto de ingeniería genética.

## SOLUCION

Pero hay una salida: el lupino. Recientes investigaciones demostraron que sus raíces aportan al suelo una enzima denominada PEPcasa, la cual se fija con gran facilidad sobre los metales de aluminio allí presentes. De este modo, esta enzima libera al fósforo del férreo abrazo de las profundidades, dejándolo disponible para ser captado por el trigo fácilmente.

Pero el agro no puede vivir únicamente de lupino, (producto hoy mucho menos rentable que el trigo, por lo demás). “Se podría plantar juntos el trigo y el lupino, pero después ¿cómo lo cosechas?”. Impensable, aplicarlo directamente. “Los costos son prohibitivos, ni soñar en eso”.

De ahí que Carillanca busque un método mucho más sofisticado. Mediante ingeniería genética, se pretende dotar al trigo, al menos de una parte de las características del lupino, específicamente, en lo referente a la capacidad de aportar citrato, que cumpliría la misma función que la PEPcasa.

Por Pedro Escobar A.

**CONGRESO ANUAL DE LA SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CHILE**

**SIMPOSIO**

**ADAPTACIÓN DE LAS PLANTAS A SUELOS ÁCIDOS; MECANISMOS Y  
ESTRATEGIAS MOLECULARES DE MEJORAMIENTO**

**23 de noviembre de 2006  
Gran Hotel Pucón, Pucón, Chile**

**Coordinador: E. Peñaloza**

**SUELOS ÁCIDOS DE CHILE: CAUSAS Y CONSECUENCIAS DE SU  
ACIDIFICACIÓN.** Pinochet, D. Instituto de Ingeniería Agraria  
y Suelos, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

**ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA MEJORAR LA ADAPTACIÓN DE LAS  
PLANTAS A LA DEFICIENCIA DE FÓSFORO EN SUELOS ÁCIDOS.**  
Peñaloza, E. Unidad de Biotecnología, INIA Carillanca,  
Temuco.

**MECANISMOS DE TOLERANCIA DE LAS PLANTAS AL EXCESO DE  
MANGANESO EN SUELOS DEL SUR DE CHILE.** Mora, M. L. y Rosas, A.  
Instituto de Agroindustria, Universidad de La Frontera,  
Temuco.

**MAPEO E INTROGRESIÓN DE GENES QUE CONFIEREN TOLERANCIA A  
ALUMINIO FITOTÓXICO EN CEREALES.** Salvo-G., H. y Soto, B. Unidad  
de Biotecnología, INIA Carillanca, Temuco.

**PLANT ADAPTATION TO ACID SOILS; STRATEGIES, CHALLENGES AND  
OPPORTUNITIES.** Delhaize, M. CSIRO, Plant Industry, Australia.

**Sociedad de Botánica de Chile  
Fundación Para la Innovación Agraria  
Unidad de Biotecnología, INIA Carillanca**

# INVITACION

La Unidad de Biotecnología de INIA Carillanca, en conjunto con la Fundación para la Innovación Agraria invitan al minisimposio “ESTRATEGIAS MOLECULARES PARA EL MEJORAMIENTO DE LA ADAPTACIÓN DE LAS PLANTAS A SUELOS ÁCIDOS”. El evento se desarrollará en viernes 24 de noviembre de 2006 entre 11:00 y 12:30 h, en el Auditorium Manuel Elgueta del Centro Regional de Investigación Carillanca.

## Programa

- |             |  |
|-------------|--|
| 11:00-11:40 | Genes de lupino en el genoma del trigo, con potencial para movilizar el fósforo inorgánico retenido en suelos ácidos.<br>Dr. Enrique Peñaloza (INIA Carillanca). |
| 11:40-11:50 | Café   |
| 11:50-12:30 | Genetic solutions for acids and phosphorus-deficient soils.<br>Dr. Manny Delhaize (SCIRO, Australia).  |

## Experto australiano

# Suelos ácidos, un problema...



Delhaize hizo una visita protocolar al director regional de Inia Carillanca y al subdirector de Investigación y Desarrollo, José María Peralta.



Los suelos ácidos necesitan de una especial atención, aplicándose enmiendas para neutralizar la acidez.

Una pieza clave del reciente Congreso Anual de la Sociedad de Biología de Chile, realizado recientemente en Pucón, donde uno de los temas centrales estuvo orientado a la adaptación de las plantas a suelos ácidos, mecanismos y estrategias moleculares de mejora-

desarrolla Inia Carillanca sobre adaptación de cultivos a suelos ácidos, proyecto a cargo del Dr. Enrique Peñaloza y financiado por FIA, el experto australiano dio a conocer su satisfacción.

### ATRACTIVO

"Encuentro que lo que se ha hecho es muy atractivo, ya que es un trabajo cercano a los temas en los que estoy interesado, y a los problemas que mis colegas en Australia están investigando. Estoy impresionado, ya que en corto tiempo han podido avanzar hacia soluciones interesantes, con elementos comunes que se unen a los objetivos de la investigación en Australia".

Agregó que "aunque soy nuevo en la realidad chilena ya estaba familiarizado de la preocupación que existía sobre la acidez en este país. Lo que han alcanzado en materia de investigación es muy importante para este región", explica.

### RESULTADOS

Sobre los resultados a largo plazo que podría tener la investigación en suelos ácidos, dice que estamos listos para tratar este tipo de suelos.

"Podemos manejar el problema de manera integrada y en conjunto con el entorno, aplicando enmiendas para neutralizar la acidez, en conjunto con la utilización de plantas tolerantes a la toxicidad por aluminio o a la deficiencia de fósforo.

Aplicando estrategias integradas podremos reducir el efecto de la acidez en los suelos y, manejándolos eficientemente, deberíamos apreciar un incremento en la productividad de los cultivos. Las plantas transgénicas pueden ser una herramienta eficaz mientras encontramos otras características para ser implementadas. Combinar genes no es la forma de resolver cada problema, pero es una herramienta que nos permite tener un respiro hasta encontrar técnicas que nos permitan asegurar el éxito de nuestros cultivos", puntualizó.

### INVESTIGACION DE INIA Y LA FIA

Cabe señalar que la Unidad de Biotecnología de Inia Carillanca, gracias a financiamiento de FIA, viene desarrollando un proyecto sobre biotecnologías aplicadas a la adaptación de los cultivos a suelos ácidos.

El proyecto se titula Integración de genes de lupino en el genoma del trigo, con potencial para movilizar el fósforo inorgánico retenido en los suelos del sur de Chile, y tiene como objetivo contribuir a reducir el uso de fertilizantes fosfatados en los cultivos mediante estrategias transgénicas.

### GENES ASOCIADOS

En este proyecto, los investigadores de Inia Carillanca están utilizando genes asociados a la capacidad de las plantas

para acumular y exudar ácidos orgánicos a través de las raíces, la que pretende, en parte, transferir al trigo.

Estos ácidos orgánicos tienen mucha afinidad por metales como aluminio y hierro a los cuales está retenido el fósforo en sue-

los ácidos.

De esta manera, los ácidos orgánicos liberan el fósforo acomplejado a estos metales, cuando son exudados en el suelo, se explicó.

"A través de este proyecto no pretendemos resolver el problema de la fija-

ción de fósforo en suelos ácidos del sur de nuestro país, sino contribuir a reducir el uso necesariamente indiscriminado de fertilizantes fosfatados en la producción de trigo", acotó el coordinador del mencionado proyecto, doctor Enrique Peñaloza.

**Experto australiano compartió con investigadores de Inia Carillanca. Fue un gran aporte en el congreso anual de la Sociedad de Biología.**



Manny Delhaize es especialista en suelos ácidos, con más de 20 años de experiencia en el tema.



Los investigadores Manny Delhaize (Australia) y Enrique Peñaloza de Inia Carillanca.

### SUELOS ACIDOS

Delhaize, quien llegó por primera vez a Chile, tiene más de 15 años trabajando en temas de nutrición de suelos, particularmente interesado en aquellos ácidos, con altos niveles de aluminio y manganeso bajo fósforo disponible.

Un tema sensible para la Región de La Araucanía, caracterizada por contar con este tipo de suelos de origen volcánico. También ha estado en otros países de Sudamérica, como Brasil y Argentina.

Respecto al trabajo que



# INTEGRACION DE GENES DE LUPINO EN EL GENOMA DEL TRIGO, CON POTENCIAL PARA MOVILIZAR EL FOSFORO INORGANICO RETENIDO EN LOS SUELOS DEL CENTRO-SUR Y SUR DE CHILE



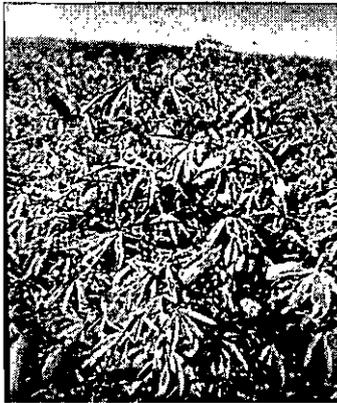
Unidad de Biotecnología, INIA Carillanca

## INTRODUCCION

Aproximadamente el 40% de la superficie arable del país (5,5 millones de ha) está representada por suelos derivados de cenizas volcánicas. Estos suelos tienen características mineralógicas y químicas que favorecen la adsorción del fósforo en los coloides, formando compuestos de baja solubilidad con aluminio y hierro. Estas reacciones químicas, conocidas como retención o fijación de fosfatos, son de particular magnitud en los suelos de la zona centro-sur y sur del país, y se acentúan significativamente por efecto de la fertilización fosfatada. Como consecuencia de sus altas tasas de retención de fosfatos (85% a 90%), aproximadamente 45.000 Ton de  $P_2O_5$ , agregado como fertilizante en cultivos de trigo, equivalente a US\$ 12 millones, quedan anualmente retenidas en estos suelos.

Un mecanismo por el cual las plantas superiores pueden movilizar el fósforo retenido en el suelo ocurre en la interfase suelo-raíz, e involucra la exudación de ácidos orgánicos. Como consecuencia de sus altas constantes de afinidad por metales como  $Al^{3+}$  y  $Fe^{3+}$ , los ácidos orgánicos de cadena corta (cítrico, malato, oxalato) pueden desplazar al fósforo ligado a estos componentes, dejándolo disponible para su utilización por las plantas.

La exudación de ácidos orgánicos ocurre en respuesta a la deficiencia de fósforo en la planta, y está restringida a un grupo selecto de especies. Entre estas se incluyen miembros de la familia Proteaceae, y el lupino blanco (*Lupinus albus*) dentro de las especies cultivadas.



En lupino blanco, la exudación de ácidos orgánicos ocurre a través de estructuras conocidas como ráculas proteoides, inducidas en la planta sólo en condiciones de deficiencia de fósforo. Esta particularidad del lupino blanco la ha convertido en una especie modelo para entender no sólo el mecanismo de exudación de ácidos orgánicos en plantas superiores, sino también para identificar genes asociados con esta estrategia adaptativa.

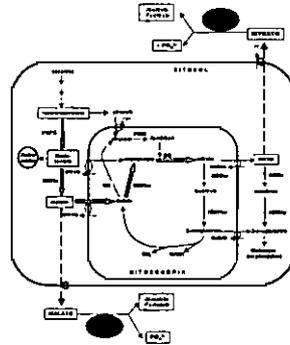


## PROPUESTA

Este proyecto plantea utilizar lupino blanco como fuente de genes para ser transferidos a otras especies cultivadas. La estrategia se aplicará en trigo, especie que concentra más del 90% de su superficie en suelos volcánicos, y que corresponde al cultivo anual de mayor importancia económica y social del centro-sur y sur del país.

Para generar cultivares de trigo que exudan ácidos orgánicos en respuesta a la deficiencia de fósforo, se utilizará la estrategia de incrementar la fijación autótrófica de carbono en raíces, mediante transgénesis con el gen que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) de lupino blanco. Esta enzima desempeña un papel esencial en la acumulación de ácidos orgánicos en ésta y otras especies, y corresponde a la única enzima con función de carboxilación en el metabolismo de los ácidos orgánicos en raíces de plantas deficientes en fósforo.

Mediante esta estrategia, se espera que la expresión del gen de la PEPC, modulado por un promotor tejido específico y activado en respuesta a la deficiencia de fósforo, dirija la utilización de su sustrato (fosfoenolpiruvato) preferentemente hacia la producción de oxalacetato. La expresión constitutiva de este gen permitirá demostrar, en un grado extremo, el efecto de esta preferencia sobre otras rutas metabólicas que utilizan el mismo sustrato. En la siguiente figura se esquematiza parte del ciclo del carbono en raíces, puntualizando la ruta metabólica que se pretende modificar mediante transgénesis en este estudio.



## OBJETIVOS DEL PROYECTO

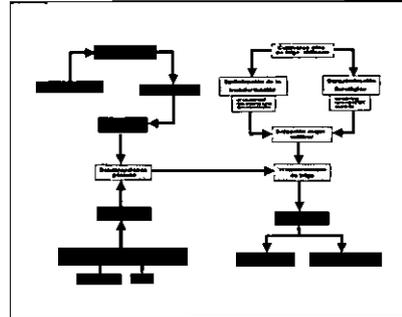
### General:

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

### Específicos:

- Aislar y caracterizar genes asociados con la exudación de ácidos orgánicos en lupino blanco.
- Identificar promotores específicos de raíces y modulados por fósforo, funcionales en trigo.
- Optimizar la transformación genética de cultivares de trigo chileno mediante biobalística.
- Evaluar en trigo, la funcionalidad de promotores específicos de raíces y modulados por fósforo.
- Transformar trigo con el gen que codifica para la enzima PEPC de lupino blanco.
- Transformar trigo con otros genes alelos desde lupino blanco.

## ESQUEMA METODOLÓGICO



## RESULTADO ESPERADO

Líneas de trigo transformadas con el gen de la PEPC de lupino blanco y otros genes, con capacidad para exudar ácidos orgánicos y movilizar fosfatos desde fuentes de fósforo de baja solubilidad.

## IMPACTO ECONÓMICO ESPERADO

- Reducción de los costos de producción de trigo en agriculturas tecnificadas.
- Aumento de la productividad del trigo en la pequeña agricultura.
- Reducción del uso e importación de fertilizantes fosfatados.
- Eventual expansión de la producción y utilización de rocas fosfáticas nacionales.

## EQUIPO TÉCNICO

### INIA Carillanca

- Enrique Peralta R. Dr., Fisiología molecular
- Gastón Muñoz V. Dr., Biología molecular
- Haroldo Salvo B. Dr., Genética molecular y transgénesis
- Ricardo Samplon R. BSc., Fertilidad de suelos
- Lorena Biaz A. Técnicas en cultivo de tejidos
- Lúcia Vera B. Química laboratorial
- Paola Rajchel F. Técnicas en biología molecular

### Universidad de Chile

- Herman Silva A. Dr., Biología molecular y transgénesis
- Luis Billa Ing. en Biotecnología
- Andrés Tlacuati Estudiante Ing. en Biotecnología
- Carlos Salas Estudiante Ing. en Biotecnología

### Universidad de Concepción

- Lolo Corvino P. Dr., Fisiología vegetal

### Colaboradores Internacionales

- Dr. Alessandro Pellegrinacci, CIMMYT, México.
- Dr. Silvio Trivella, University of Zurich, Suiza.
- Dr. John Snape, John Innes Centre, UK.

### Coordinador del proyecto

- Dr. Enrique Peralta, INIA Carillanca, Temuco
- Email: eperalta@carillanca.inia.cl

Proyecto financiado por la Fundación para la Innovación Agraria (FOY 01-L-05), en conjunto con el Instituto de Investigaciones Agrarias, la Universidad de Chile y la Universidad de Concepción.

# EXPRESION Y ACTIVIDAD FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA EN RAICES PROTEOIDEAS DE LUPINO BLANCO DEFICIENTE EN FOSFATO

Enrique Peñaloza\*, Gastón Muñoz y Haroldo Salvo-G

Unidad de Biotecnología, INIA Carillanca, Casilla 58-D, Temuco. \*epenaloza@carillanca.inia.cl

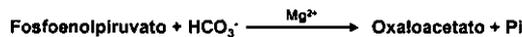


## RESUMEN

Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) cataliza una ruta metabólica alternativa para la síntesis de piruvato en plantas. En lupino blanco (*Lupinus albus*), PEPC contribuye a la fijación de carbono y acumulación de citrato en raíces deficientes en fósforo (P). Este citrato es exudado en la rizósfera, permitiendo a la planta movilizar el P inorgánico retenido en el suelo. La exudación ocurre a través de raíces proteoideas, y está espacialmente localizada en conglomerados de raicillas "maduras". Utilizando este tejido como modelo para estudiar expresión de genes asociados a esta estrategia adaptativa, se aislaron dos fragmentos cDNA que codifican para PEPC (PEPC-A y PEPC-B). Con el objetivo de caracterizar la regulación PEPC en respuesta a P, se analizó la expresión PEPC-A y la actividad PEPC de raíces proteoideas. Hibridaciones "northern" detectaron dos transcritos que se expresan preferentemente en raicillas proteoideas maduras, lo cual confirma la presencia de al menos dos probables mensajeros que codifican para PEPC en este tejido radical. Esta expresión se correlacionó con la actividad PEPC *in vitro*, indicando que PEPC desempeña un papel esencial en tejidos radiculares que acumulan y exudan citrato en respuesta a la deficiencia de P en lupino blanco.

## INTRODUCCION

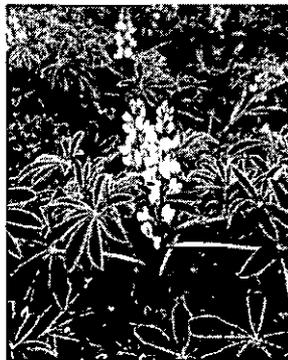
Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) es una enzima citosólica involucrada en varios procesos fisiológicos de plantas. Esta enzima cumple un papel esencial en la eficiencia fotosintética de plantas C<sub>4</sub>, así como en el reemplazo de intermediarios del Ciclo de Krebs para la síntesis de aminoácidos en plantas C<sub>3</sub>. PEPC cataliza la carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato, generando oxaloacetato y fosfato inorgánico (Pi) como productos.



En plantas deficientes en Pi, PEPC participa en la fijación de carbono y acumulación de ácidos orgánicos en raíces. Estos ácidos orgánicos son exudados en la rizósfera, donde contribuyen a movilizar Pi retenido en el suelo.

La exudación de ácidos orgánicos en respuesta a la deficiencia de Pi es una estrategia característica sólo de algunas especies, entre las que se incluye el lupino blanco (*Lupinus albus*). En esta especie, la exudación ocurre a través de raíces proteoideas, estructuras especializadas en la síntesis y excreción de citrato en la rizósfera.

Como parte de un proyecto dirigido a identificar genes que se expresan en raíces proteoideas de lupino blanco, se aislaron dos cDNAs parciales que codifican para PEPC (PEPC-A y PEPC-B). En este estudio se caracteriza la expresión de uno de ellos, y la actividad PEPC en diferentes tejidos radicales.



**OBJETIVO.** Analizar la expresión PEPC-A en respuesta a Pi, determinar las probables isoformas PEPC, y cuantificar la actividad PEPC en raíces proteoideas de lupino blanco.

## MÉTODOS

**Expresión PEPC.** La expresión de transcritos se analizó mediante "Northern blot" con ARN extraído en diferentes fechas de muestreo y desde diferentes tejidos de plantas deficientes y suficientes en P (0,1 mM). El ARN total (10 µg) se hibridó con una secuencia parcial de 313 nucleótidos (PEPC-A) marcada con <sup>32</sup>P, y se visualizó mediante autoradiografía.

**Isoformas PEPC.** Para correlacionar la expresión de transcritos con probables isoformas PEPC en raíces proteoideas, se evaluó actividad PEPC en geles nativos (7% acrilamida) equilibrados en bis-Tris propano, y visualizados bajo luz UV posterior a la incubación en bis-Tris propano conteniendo fosfoenolpiruvato (PEP), malato dehidrogenasa (MDH) y NADH.

**Actividad PEPC *in vitro*.** Se evaluó en extractos obtenidos desde diversas secciones de una raíz proteoidea (Fig. 3b), en una reacción acoplada a la enzima MDH, en presencia de PEP y NADH. Las proteínas totales se cuantificaron mediante el método de Bradford.

## RESULTADOS

### Expresión PEPC

Utilizando PEPC-A como sonda, se identificaron dos transcritos que comienzan a expresarse en raíces a los 24 DDT (días después del trasplante a la solución nutritiva), preferentemente en ausencia de P (Fig. 1A). La mayor expresión ocurre en raíces proteoideas (Fig. 1B), y se acentúa en conglomerados maduros (raicillas proteoideas que han alcanzado su longitud definitiva de 4-5 mm) (Fig. 1C). La separación de un conglomerado maduro en raicillas y eje indica que ambos transcritos se expresan con particular intensidad en raicillas (Fig. 1D).

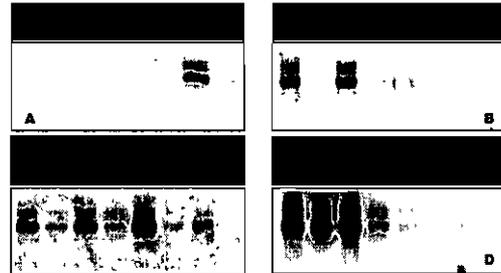


Fig. 1. Expresión PEPC en lupino blanco deficiente (-P) y suficiente (+P) en fosfato. (A) en raíces totales a 0, 8, 18 y 24 DDT; (B) en raíces totales, raíces proteoideas, ápice de raíz normal y hojas, a los 24 DDT; (C) en diferentes secciones de una raíz proteoidea a los 24 DDT; (D) en raicillas y eje de conglomerados maduros, 24 y 72 h después de rescatados de la deficiencia de P mediante la incorporación de 0,1mM P (+P), comparado con un conglomerado -P.

### Isoformas PEPC

Electroforesis en condiciones no denaturantes detectaron al menos dos probables isoformas con actividad PEPC en conglomerados maduros de una raíz proteoidea. Ambas isoformas están presentes en raicillas, en tanto que sólo una es evidente en el eje de un conglomerado (Fig. 2). Una de estas isoformas presenta mayor actividad relativa PEPC en raicillas, y pudiera estar relacionada con la expresión de transcritos que se observa en la Fig. 1D.



Fig. 2. Isoformas PEPC en raicillas y eje de un conglomerado maduro

### Actividad PEPC *in vitro*

La mayor actividad PEPC en el perfil de una raíz proteoidea se observó en conglomerados maduros (Fig. 3A), que corresponden a los sitios de exudación de citrato en lupino blanco. Esta exudación es evidente cuando las raíces proteoideas se incuban en un sustrato conteniendo un indicador de pH (Fig. 3B). Cuando el conglomerado maduro se separa en raicillas y eje, la actividad PEPC se incrementa notablemente en raicillas (Fig. 3C).

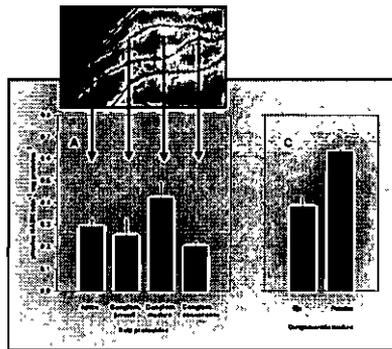
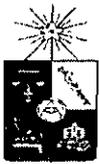


Fig. 3. Actividad PEPC en raíces proteoideas de lupino blanco. La actividad se cuantificó en cuatro secciones de una raíz proteoidea (A), y en raicillas y eje separados desde un conglomerado maduro (C). La incubación de raíces proteoideas en un sustrato conteniendo un indicador de pH permite visualizar los sitios de exudación de citrato en esta especie (B).

## CONCLUSION

Se detectaron al menos dos transcritos que codifican para PEPC en raíces proteoideas, y que se expresan preferentemente en raicillas de un conglomerado maduro. Geles nativos confirmaron la presencia de al menos dos isoformas con actividad PEPC en este tejido radical, el que se caracterizó por intensa actividad PEPC *in vitro*. Una o ambas isoformas estarían contribuyendo a la síntesis y acumulación tejido-específica de citrato en raíces proteoideas de lupino blanco.

Este estudio corresponde a parte del proyecto "Integración de genes de lupino en el genoma del Ingo, con potencial para movilizar el fósforo inorgánico retenido en los suelos del centro-sur y sur de Chile" (FIA, BIOT 01-A-36)



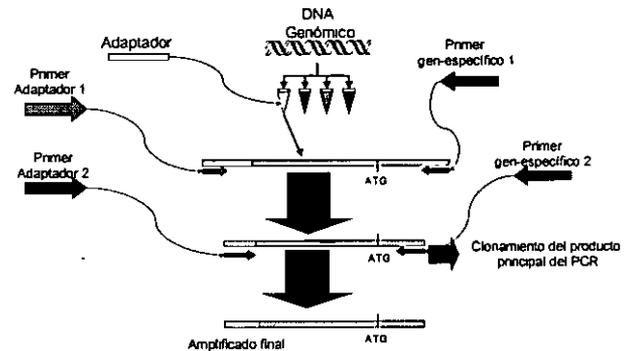
# OBTENCION DE PROMOTORES RAIZ-ESPECIFICOS, REGULADOS NEGATIVAMENTE POR FOSFORO EN *Triticum aestivum* Y *Arabidopsis thaliana*.

(Isolation of root-specific promoters from *Triticum aestivum* and *Arabidopsis thaliana*, down regulated by phosphorus).

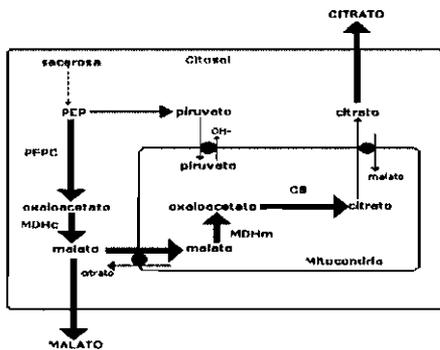
Milla, L., Tittarelli, A., Salas, C., y Silva, H. Lab. Gen Mol Veg, Fac. Ciencias, U. de Chile

## Resumen

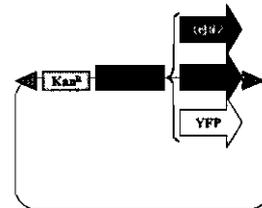
La deficiencia de fosfatos (Pi) es un problema generalizado en suelos volcánicos del centro-sur y sur de Chile. En plantas, esta deficiencia se traduce en la expresión de genes específicos para aumentar la eficiencia de absorción y movilización de Pi desde el suelo. Entre estos se incluyen genes que codifican para transportadores de Pi de alta afinidad, o fosfatasa exudada desde la raíz, descritos en modelos vegetales como *Arabidopsis thaliana* y tomate (1). Con el objetivo de identificar promotores raíz-específicos y modulados por Pi, en este trabajo, se aislaron los promotores de genes transportadores de Pi de alta afinidad desde *Arabidopsis* (AtPT1, AtPT2) (2) y trigo (TaPT1 y TaPT2), además de una fosfatasa ácida de *Arabidopsis* (PAP1) (3). Estudios de expresión de los genes TaPT1 y TaPT2 sugieren una mayor inducción de TaPT2 bajo deficiencia de Pi y de expresión tejido-específica. Con estos promotores se transformarán plantas de *Arabidopsis* y trigos modelo, monitoreados mediante la expresión de genes reporteros (GUS y YFP). El promotor más promisorio se utilizará para dirigir la expresión de genes asociados con la tolerancia a la deficiencia de Pi, en cultivares élite de trigo chileno.



**Figura 3.** Estrategia de clonamiento de los promotores de los transportadores de fosfato de alta afinidad de trigo. Con este fin se construyeron "librerías genómicas", utilizando endonucleasas de restricción de diferente frecuencia de corte, y ligando con un "adaptador". Esta secuencia permite realizar un "nested PCR", con partidores específicos para TaPT1/PT2 y el adaptador.



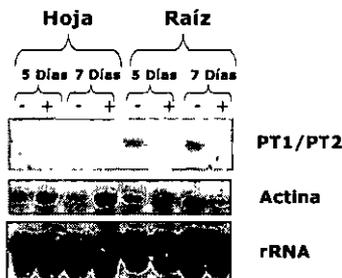
**Figura 1.** Vía metabólica de la producción de aniones orgánicos (citrato y malato). Un aumento en su biosíntesis se podría lograr con un incremento en la presencia de algunas enzimas de esta vía. Este aumento enzimático debe ser específico de un tejido y regulado por la disponibilidad de fósforo.



**Figura 4.** Se generaron constructos que contienen un promotor (APT1, AtPT2, PAP1) regulando la expresión de un gen reportero, que puede ser GFP, GUS o YFP. Con estos constructos se transformarán *A. thaliana* y *T. aestivum* para realizar estudios de presencia y localización de estas proteínas. La obtención de plantas transgénicas aún está en proceso.

Posición elemento NIT2 TATCA/(T)A/(T)	Promotor
-75, -435, -1017, -1039	PAP1
-1352, -1634, -2062, -2188	AtPT2
-254, -1562, -1902	APT1

**Tabla 1.** Para determinar el tamaño de cada promotor, se buscaron elementos regulatorios conservados. El elemento NIT2 se encuentra presente a lo largo de estos promotores, en forma frecuente.



**Figura 2.** Evaluación de la expresión de los genes que codifican para transportadores de fosfato en *Triticum aestivum*, mediante análisis de Northern Blot. Se utilizó RNA total extraído de hojas y raíces de plantas de trigo crecidas por 5 días en presencia (+) o ausencia (-) de Pi. El RNA se hibridó con sondas marcadas con <sup>32</sup>P, para TaPT1/PT2, actina y rRNA. La sonda para actina de trigo fue obtenida mediante PCR utilizando partidores para actina de *Arabidopsis*. La sonda para rRNA pertenece a una secuencia amplificada de *Arabidopsis*.

Promotor	Tamaño	Gen asociado	Gen reportero	Estado
APT1	2 kb	Transportador de fosfato de alta afinidad ( <i>A. thaliana</i> )	GUS, GFP, YFP	Clonado en vector binario y generándose plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> y <i>T. aestivum</i> (GUS). Para GFP y YFP, clonándose en vector binario
AtPT2	2,5 kb	Transportador de fosfato de alta afinidad ( <i>A. thaliana</i> )	GUS	En proceso
AtPT2	1,4 kb	Transportador de fosfato de alta afinidad ( <i>A. thaliana</i> )	GUS	Clonado en pGEMT
PAP1	1,2 kb	Fosfatasa ácida exudada ( <i>A. thaliana</i> )	GUS	En proceso
TaPT1	Indeterminado	Transportador de fosfato de alta afinidad ( <i>T. aestivum</i> )		Poniendo técnica a punto
TaPT2	Indeterminado	Transportador de fosfato de alta afinidad ( <i>T. aestivum</i> )		Poniendo técnica a punto

**Tabla 2.** Constructos que se están generando en el laboratorio

## Resultados y Conclusiones

•TaPT1/PT2 de trigo son específicos de raíces y regulados negativamente por presencia de fósforo.

•Se aislaron promotores, los cuales fusionados a genes reporteros, nos permitirán estudiar su regulación por Pi.

•Se transformaron plantas de *A. thaliana* con dichos constructos.

## Referencias

- Raghothama KG. 1999. *Annu. Rev. Plant Phys.* 50: 665-693
- Karthikayan AS, Varadarajan DK, Mukatira UT, D'Urzo MP, Damsz B and Raghothama KG. 2002. *Plant Phys.* 130: 221-233



Financiamiento: FIA (BIOT 01-A-36). Trabajo realizado en conjunto con Peñaloza, E., Salvo, H. y Muñoz, G. Unidad de Biotecnología, INIA Carillanca.

# Tres isoformas fosfoenolpiruvato carboxilasa en raíces proteoideas de lupino blanco blanco diferencialmente reguladas por fosfatos

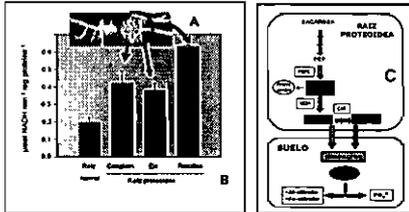
## Three phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in proteoid roots of white lupin differentially regulated by phosphate

Enrique Peñañoza<sup>1(\*)</sup>, Gastón Muñoz<sup>1</sup>, Haroldo Salvo-G<sup>1</sup>, Herman Silva<sup>2</sup> y Luis J. Corcuera<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biotecnología, INIA Carillanca, Temuco  
<sup>2</sup>Departamento de Biología, Universidad de Chile, Santiago  
<sup>3</sup>Departamento de Botánica, Universidad de Concepción, Concepción  
(\*penañoza@carillanca.inia.cl)

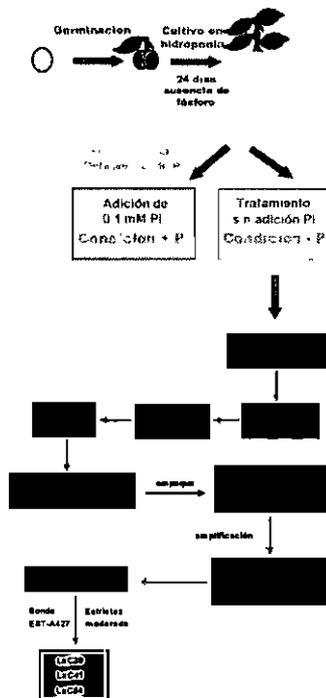


Raíces proteoideas del lupino blanco: estructuras responsables de la adaptación de la especie a la deficiencia de fosfatos



Las raíces proteoideas de lupino blanco (*Lupinus albus*) corresponden a conglomerados de raicillas que comienzan a aparecer secuencialmente a través del perfil de una raíz primaria lateral (Panel A). En estos conglomerados ocurren alteraciones en el metabolismo celular inducidas por la deficiencia de fosfatos (P<sub>i</sub>), como incrementos en la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) (Panel B), que finalmente se traducen en la acumulación de citrato. El citrato acumulado en estas estructuras radiculares es exudado en la rizósfera, permitiéndole a la especie movilizar P<sub>i</sub> desde fuentes de P<sub>i</sub> de baja solubilidad (Panel C). Considerando la significativa contribución de esta enzima en la síntesis de carbono no autótrofo, PEPC desempeñaría una función esencial en la estrategia adaptativa de lupino blanco en respuesta a la deficiencia de P<sub>i</sub>. En este trabajo se identificaron tres cDNAs que codifican para PEPC en raicillas proteoideas, y se estudió su regulación por fosfatos.

Modelo experimental utilizado para aislar PEPC cDNAs y realizar estudios de expresión



El escrutinio de la genética de expresión construida desde raicillas proteoideas de lupino blanco permitió identificar diez clones que codifican para PEPC. De acuerdo a los análisis de secuencias, los diez clones se agruparon en tres categorías, representadas por LaC36, LaC41 y LaC54.

### RESUMEN

Las raíces proteoideas de lupino blanco (*Lupinus albus*) son estructuras inducidas en ausencia de fosfatos (P<sub>i</sub>), especializadas en la excreción de citrato en la rizósfera. Este exudado está precedido de incrementos en actividad PEPC y acumulación de ácidos orgánicos, y se localiza especialmente en raicillas proteoideas "maduras". Estudios de expresión diferencial de genes en este tejido permitieron aislar un cDNA que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC). Este cDNA se utilizó en el escrutinio de una librería de expresión, identificándose tres clones que codifican para PEPC similares en la región traducida, pero que difieren en la región 3'UTR. Análisis de northern indicaron que los tres transcritos se expresan preferentemente en raíces proteoideas deficientes en P<sub>i</sub>, pero sin diferencias evidentes entre ellas. Utilizando primarios específicos para amplificar la región 3'UTR, análisis mediante RT-PCR permitieron discriminar la expresión de cada transcrito tanto en función de su abundancia relativa, como en su respuesta a la presencia o ausencia de P<sub>i</sub>. Sobre la base de diferencias en la región 3'UTR y los estudios de expresión, se concluye que al menos tres probables isoformas PEPC estarían asociadas a la acumulación de citrato en raíces proteoideas de lupino blanco, moduladas diferencialmente por la concentración de P<sub>i</sub> en el tejido.

Tres diferentes transcritos que codifican para PEPC están presentes en raicillas proteoideas de lupino blanco

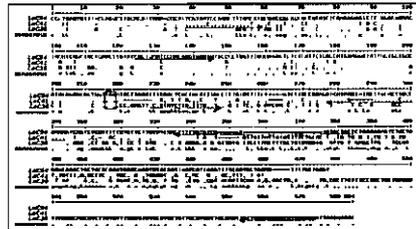


FIGURA 1. Alineamiento del extremo 3' de las secuencias de los tres clones PEPC aislados desde raicillas proteoideas de lupino blanco. Se muestra enmarcado el codón de término de la región codificante y la región 3' no traducida (3'UTR).

Análisis de Northern no permiten discriminar claramente la expresión de los tres transcritos de PEPC

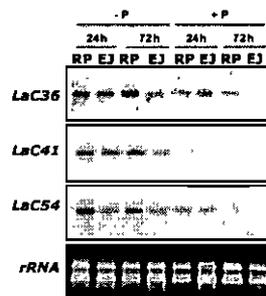


FIGURA 2. Los análisis mediante northern se realizaron en raicillas proteoideas (RP) y eje de la raíz (EJ), muestreadas a las 24 y 72 h posterior al rescate de las plantas de la deficiencia de P<sub>i</sub>. La alta homología de secuencias en la región codificante sugirieron la posibilidad de hibridación cruzada y, por lo tanto, la necesidad de utilizar técnicas más sensibles para discriminar una probable expresión diferencial.

### CONCLUSION

Sobre la base de diferencias en la región 3'UTR y de estudios de expresión de transcritos, existirían al menos tres probables isoformas PEPC en raicillas proteoideas de lupino blanco, cuyos mRNAs serían reguladas diferencialmente por la disponibilidad de P<sub>i</sub> en el tejido.

Esta investigación corresponde a parte del proyecto BIOT-01-A-36 financiado por la Fundación Para la Innovación Agraria (FIA) y el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INA)

La abundancia relativa de los tres transcritos de PEPC difieren en la respuesta a fosfatos

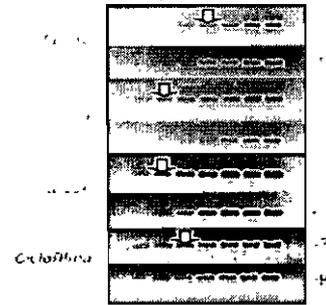


FIGURA 3. Acumulación de productos PCR (RT-PCR) en raicillas proteoideas tanto rescatadas como mantenidas en deficiencia de P<sub>i</sub>. Para cada PEPC, los primarios específicos utilizados en los análisis mediante RT-PCR se indican con flechas en la Figura 1. Como control interno se utilizó el gen de ciclofilinas

La expresión de los tres transcritos de PEPC está asociada al contenido intracelular de fosfatos



FIGURA 4. Cinética de transcritos PEPC determinada mediante RT-PCR en raicillas proteoideas de lupino blanco. Los análisis se realizaron a diferentes tiempos posterior al rescate de la deficiencia de P<sub>i</sub>. Como control interno se utilizó el gen de ciclofilinas

La expresión de los tres transcritos de PEPC es tejido específica

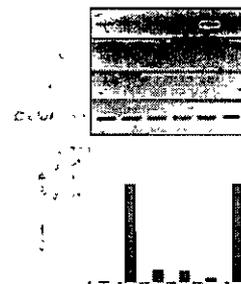


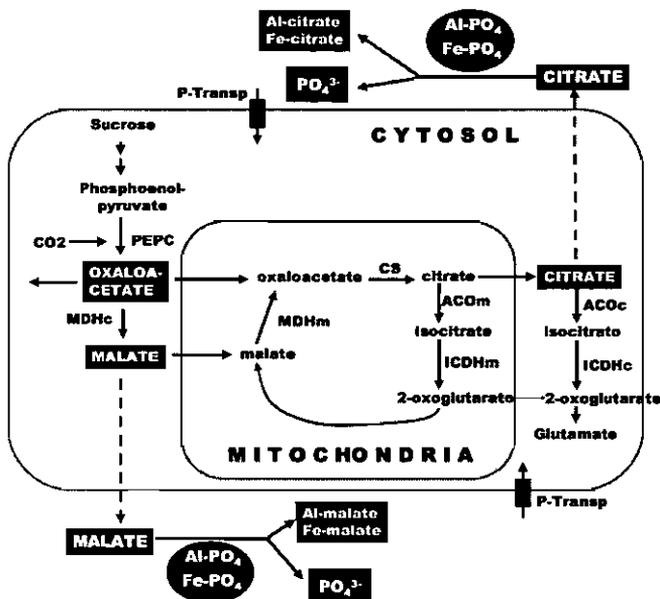
FIGURA 5. Expresión de transcritos de PEPC en diversos tejidos de lupino blanco. Se realizaron análisis mediante RT-PCR en raíces enteras (RT), cotiledones (CO) y hojas (H) de plantas mantenidas tanto en ausencia (-P) como en presencia de 0,1 mM de P<sub>i</sub> (+P). Como control interno se utilizó el gen de ciclofilinas.

# INTEGRATION OF LUPINE GENES INTO WHEAT GENOME WITH THE ABILITY TO EXUDATE ORGANIC ACIDS AND RELEASE P FROM VOLCANIC SOILS

INIA Carillanca, Unidad de Biotecnología  
Project supported by Fundación para la Innovación Agraria (BIOT 01-A-36)

## Introduction

Phosphorous (P) is one of the less available nutrient in soils and one of the major limiting factors for plant growth, specially in volcanic-derived soil. In Chile, these soils are located in the south and center-south covering about 40% of the arable surface (5,5 millions of ha). The chemistry properties of these soils allow phosphorus (P) absorption by formation of low soluble compounds with iron (Fe<sup>3+</sup>) and aluminum (Al<sup>3+</sup>). Thus the high rates of P-fixation (85% to 90%) are negatively affecting the fertilization practices, and about 45,000 Tons of the P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> added to wheat crop are retained in the soils per year. Economical losses are estimates for over than US\$ 12 millions. Some plants have developed metabolic and morphological strategies to acquire P from the environment. This include changes in root growth and architecture, increased production of P-scavenging enzymes such as phosphatase, induction of high affinity phosphate (P<sub>i</sub>) transporters, and release of organic acids. Organic acids like citrate, malate and oxalate, have high affinity constants with metals such as Al<sup>3+</sup> and Fe<sup>3+</sup> thus being able to form chelates, allowing P desorption.



Release of organic acid at rates enough to cause P desorption has been reported in a limited number of plants species. White lupine (*Lupinus albus*) is known as one of the best plants resistant to P deficiency stress. Organic acid release by this species occurs through proteoid rootlets which are developed under P deficiency. Thereby white lupine is being studied as a model to understand the physiologic and molecular basis of this adaptive response. Genes related to this pathway are being integrated into wheat genome and their expression patterns are under study with the aim of transfer this strategy to wheat and improve its adaptation to this abiotic stress.

## Proposal

The goal is to use white lupine as source of genes for the integration into other important crops genomes, like wheat.

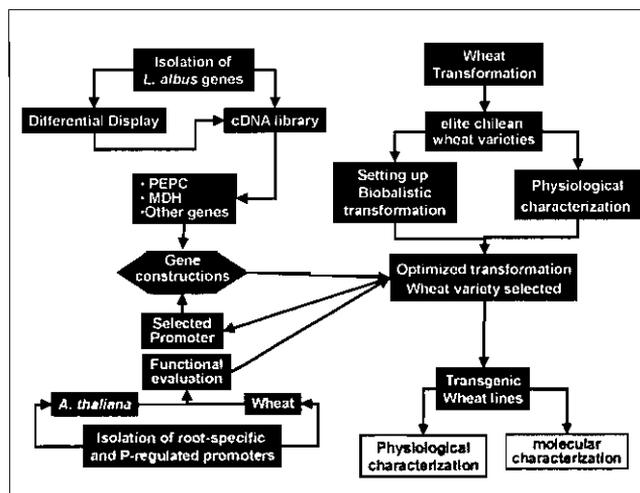
- More than 90% of the wheat area is cultivated on volcanic, acid soils in Chile.
- Wheat is the most important crop in this area and it plays an important economical and social role
- This cereal does not exude organic acids and is unable to solubilize P from P-fixing soils.

Thus, the main objective is to integrate, by genetic transformation, lupine genes into wheat genome, with the ability of exudates organic acids under P deficiency. Since genes associated to P deficiency are expressed only under this circumstances, specific promoters are being isolated and its functionality on wheat genome is under evaluation. This work is the first approach in Chile towards the adaptation of wheat to this abiotic stress by metabolic engineering. The work is also allowing the integration of researcher from either Chilean institution or International Centers and Universities.

## Approach

The approach includes the following aims:

1. Isolation of white lupine genes involved in organic acid exudation. Using the differential display methodology, cDNA fragments specifically expressed under P deficiency are being isolated, sequenced and identified by homology to known genes. These cDNAs are used then to isolate the full length cDNAs from a cDNA library made from proteoid roots. Novel genes or those directly involved in organic acid metabolism are under selection.
2. Isolation of root-specific and P-regulated plant promoters. Heterologous promoters previously identified in *A. thaliana* are being obtained by PCR. Homologous promoters from wheat are also under isolation using the genome-walking technology. The promoters are finally fused to reporter genes such as *gus* in a way of study its tissue localization and expression patterns.
3. Genetic transformation is being applied on model wheat for transformation.
4. Genetic transformation of wheat Chilean varieties are also optimized using *gus* and selected genes fused to a constitutive promoter. At the same time, Chilean wheat varieties will be characterized in order to determine their response to P deficiency.
5. The best promoters-genes combination will be integrated into selected Chilean varieties. Clean technology for transformation will be applied and fully characterization at the genetic and molecular level will be developed. The functionality will also be characterized at the molecular and physiological level to determine gene integration and impact on organic acid metabolism and exudation.
6. The novel Chilean varieties will be evaluated on field to evaluate their performance.



## Expected results and impacts

The main expected result will be the development of transgenic wheat harbouring white lupine genes with the ability to exudate organic acids and release P from volcanic soils.

## This new variety should have impact on:

- Lowering addition of P fertilizers
- Lowering cost of crop production
- Increasing crop productivity
- Amenable environmental practices

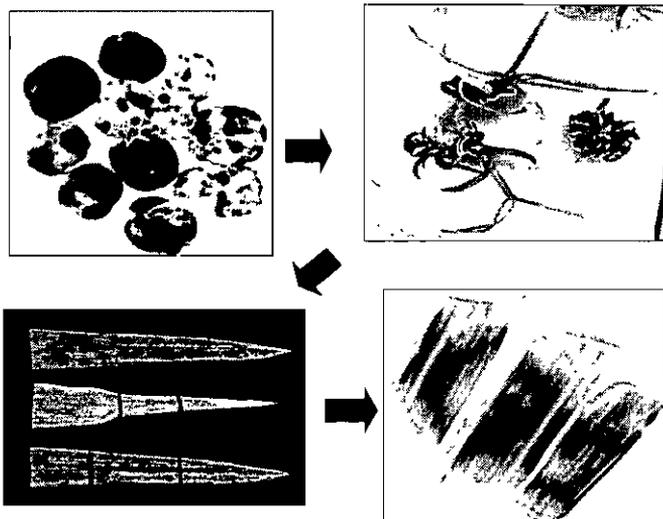
## Technological products:

- Clean wheat transformation technology
- Genes involved in organic acid metabolism and exudation
- Root-specific and P-regulated promoters

## Researchers and Institutions Involved

**Unidad de Biotecnología, INIA Carillanca**  
 Enrique Peñafoza<sup>1</sup>, Dr. Molecular Plant Physiology  
 Gastón Muñoz V., Dr. Molecular Biology and Genetic Engineering  
 Haroldo Salvo G., Dr. Molecular Genetics and Genetic Engineering  
 Ricardo Campillo R., MSc. Soil Fertility  
 Lorena Díaz A. Tissue Culture Technician  
 Paola Rathgeb F. Molecular Biology Technician  
**Universidad de Chile**  
 Herman Silva A., Dr. Plant Molecular Biology  
 Luis Milla Graduate student  
 Andres Titarelli Graduate student  
 Claudia Neupert Graduate student  
**Universidad de Concepción**  
 Lula Corcuera P. Dr. Plant Physiology  
**International Collaborators**  
 Dr. Alessandro Pellegrineschi, CIMMYT-ABC, México.  
 Dr. John Snape, John Innes Centre, UK.  
 Dr. Silvia Trivella, University of Zurich, Suiza.

(\*) Project Coordinator, E-mail: epena@carillanca.inia.cl



# 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

Enrique Peñaloza<sup>1</sup>, Gastón Muñoz<sup>2</sup>, Haroldo Saivo-G.<sup>1</sup>, Herman Silva<sup>2</sup>, Ricardo Campillo<sup>1</sup>, Luis J. Corcuera<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biotecnología, INIA Carillanca, Temuco; <sup>2</sup>Centro de Biotecnología Vegetal, Universidad Andrés Bello, Santiago; <sup>3</sup>Departamento de Botánica, Universidad de Concepción, Concepción. \*epenalo@inia.cl



La agricultura del centro-sur y sur de Chile se desarrolla en suelos con pH entre 4,5 y 5,5, lo que favorece la adsorción del fósforo a óxidos de aluminio y hierro. Como consecuencia, entre el 85 a 95% del fósforo aplicado como fertilizante queda inmovilizado. En términos económicos, esto se traduce en la acumulación de fósforo inorgánico equivalente a aproximadamente U\$ 20 millones anuales.

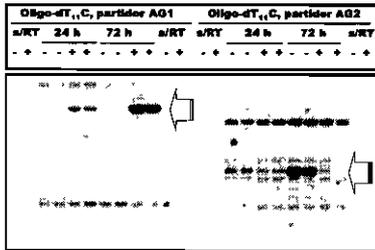
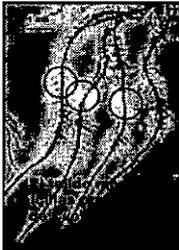


Una de las estrategias utilizadas por las plantas superiores para movilizar el fósforo retenido en el suelo consiste en la excreción de ácidos orgánicos inducida en respuesta a la deficiencia de este nutriente. En la rizósfera, ácidos orgánicos de cadena corta (citrato, malato) desplazan el fósforo desde el complejo de intercambio a la fracción soluble, desde donde puede ser utilizado por las plantas. Esta estrategia, sin embargo, está restringida sólo a un grupo selecto de plantas, dentro de las que se incluye el *Lupinus albus* entre las especies cultivadas.

Puesto que la excreción de ácidos orgánicos en respuesta a la deficiencia de fósforo no está presente en trigo, en esta propuesta se está utilizando *L. albus* como modelo para identificar genes asociados a la síntesis y acumulación de ácidos orgánicos en raíces, e integrarlos en el genoma del trigo.

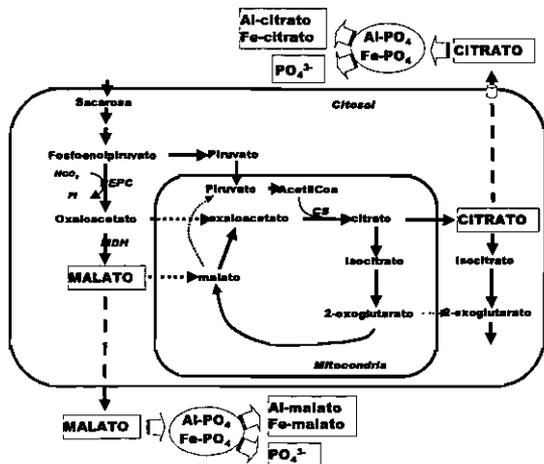
## AISLAMIENTO DE GENES DESDE LUPINO

La identificación de genes se realizó mediante "differential display" de ARNm, utilizando raicillas proteoideas de *L. albus* como tejido modelo. Se observó expresión diferencial en 55 productos, entre aproximadamente 4.000 ARNm visualizados. Los genes de interés se aislaron desde una librería de expresión obteniéndose el ADNc de largo completo de siete genes, entre los que se incluyen malato dehidrogenasa (MDH) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC).



## INTEGRACIÓN DE GENES DE LUPINO EN TRIGO

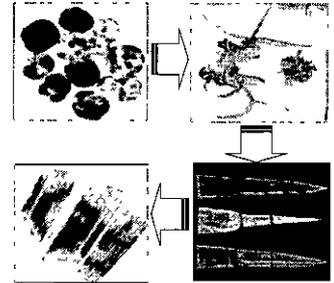
Para incorporar en el trigo la capacidad de acumular ácidos orgánicos en raíces, en esta propuesta se está integrando en su genoma el ADN que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC). PEPC cumple una función de reciclaje de carbono no autótrofo, contribuyendo a la acumulación de ácidos orgánicos particularmente en condiciones de deficiencia de fósforo en la planta.



Con el propósito de minimizar el gasto metabólico de una expresión constitutiva, la estrategia se complementó con la utilización de promotores raíz-específicos e inducibles por la deficiencia de fósforo. Los promotores seleccionados para modular la expresión PEPC correspondieron a transportadores de fosfato de alta afinidad (*Phf*). En este estudio se evaluaron los promotores *AtPhf1;2* (2,1 Kb) y *AtPhf1;4* (3,0 Kb) de *Arabidopsis*, y *TaPhf2* (0,6 Kb) de trigo, aislados mediante Genome Walker

## TRANSFORMACIÓN DE TRIGOS

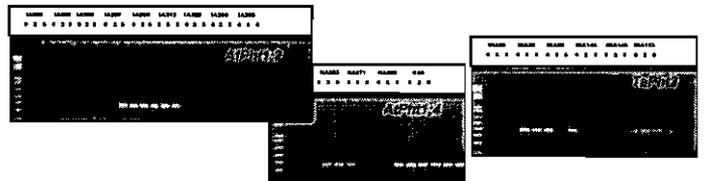
Las condiciones de transformación de trigos se optimizaron con la construcción *ubi-gus* integrada en el genoma de cuatro cultivares mediante biobalística, en un esquema de co-transformación con la construcción *ubi-bar*. Se obtuvo expresión transiente y constitutiva en todos los cultivares, pero con una eficiencia de co-transformación 50% superior en Bobwhite.



## FUNCIONALIDAD DE PROMOTORES

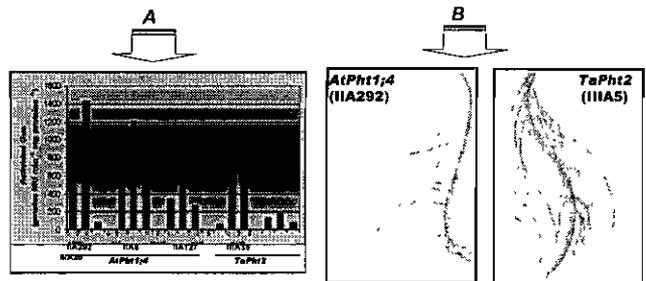
Para evaluar la funcionalidad de los promotores, *AtPhf1;1*, *AtPhf1;4* y *TaPhf2* se fusionaron al gen reportero *gus* y se integraron en el genoma de trigo Bobwhite, co-transformado con la construcción *ubi-bar* como gen de selección. Los análisis se realizaron en líneas homocigotas T<sub>2</sub>.

Mediante RT-PCR se detectó expresión de transcritos *gus* en 30% de un total de 20 eventos de transformación independientes analizados.



Entre los tres promotores evaluados, análisis del tipo "Northern" detectaron expresión *AtPhf1;2* tanto en hojas como raíces de trigo, descartándose este promotor en los estudios posteriores.

El análisis fluorométrico de eventos RT-PCR positivos para *AtPhf1;4* y *TaPhf2* indicó baja actividad de la proteína Gus (A), consistentes con la escasa tinción Gus que se detectó a nivel histoquímico (B).



Considerando evidencia reciente que demuestra que la expresión de transgenes en monocotiledóneas puede incrementarse mediante intrones, las construcciones se complementaron con la incorporación del intrón *adh1* de maíz. Actualmente estamos transformando trigo Bobwhite con las construcciones *AtPhf1;4-adh1* y *TaPhf1;2-adh1* fusionadas a PEPC, en el que se evaluará la concentración de ácidos orgánicos en raíces, y la capacidad para excretarlos en la rizósfera y movilizar fósforo desde fuentes de baja solubilidad.

# RAÍCES PROTEOIDEAS DE *Lupinus albus* COMO MODELO PARA AISLAR GENES ASOCIADOS CON LA ADAPTACIÓN DE LAS PLANTAS A LA DEFICIENCIA DE FÓSFORO

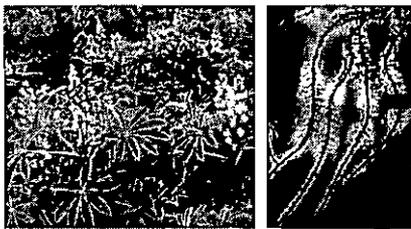


**Enrique Peñaloza<sup>1\*</sup>, Gastón Muñoz<sup>1</sup>, Haroldo Salvo-G<sup>1</sup>, Luis J. Corcuera<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Unidad de Biotecnología, INIA Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile; <sup>2</sup>Departamento de Botánica, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile. \*epenalo@inia.cl

## Introducción

La respuesta de las plantas a la deficiencia de fósforo (P) involucra modificaciones estructurales y metabólicas dirigidas a utilizar más eficientemente el P disponible. En *Lupinus albus*, esta respuesta se expresa con la formación de raíces proteoideas, estructuras especializadas en la síntesis, acumulación y exudación de citrato en la rizosfera (Figura 1)



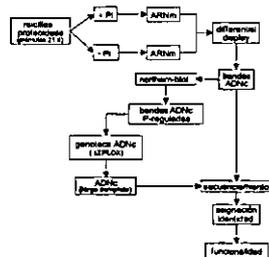
**Figura 1.** *Lupinus albus* en floración, y raíces proteoideas de *L. albus* mostrando los sitios de exudación de citrato

La exudación de citrato en la rizosfera adquiere particular relevancia en suelos ácidos, donde el P se encuentra formando complejos con el aluminio y el hierro. La fuerte afinidad del citrato por estos metales desplaza el P del complejo de intercambio, dejándolo disponible para la planta. En el sur de Chile, los suelos ácidos representan más del 90% de los suelos cultivables, en los cuales la fijación de P se constituye en un problema agronómico de magnitud.

En este trabajo se resume parte de los resultados de una línea de investigación en estrés abiótico característicos de suelos ácidos, en la que se está identificando genes asociados con la adaptación de las plantas a la deficiencia de P, utilizando *L. albus* como especie modelo

## Metodología

El aislamiento de genes se realizó desde raíces proteoideas de *L. albus* deficiente en P<sub>i</sub> y rescatado de la deficiencia de P<sup>(1,2)</sup>. El ARN obtenido desde ambos tejidos se contrastó mediante "differential display" de ARNm<sup>(3)</sup>. Las bandas diferenciales se aislaron, clonaron y secuenciaron, confirmando la expresión de ARNm mediante "northern blot". Finalmente se construyó una genoteca de expresión desde raíces proteoideas, la que se está utilizando para aislar el ADNc de largo completo de genes de interés (Figura 2).

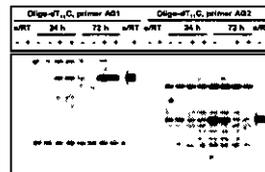


**Figura 2.** Esquema utilizado para aislar genes regulados por P en raíces proteoideas de *L. albus*.

## Resultados

Mediante "differential display" se visualizaron aproximadamente 6000 ARNm, generados por la combinación de tres partidores de anclaje y 40 partidores arbitrarios. Se observó expresión diferencial en respuesta a la disponibilidad de P en 60 productos. Los análisis del tipo "northern" confirmaron esta expresión en 55 de ellos, indicando que alrededor del 1% de la población de ARNm se expresaría diferencialmente en nuestro tejido modelo (Figura 3)

El análisis de secuencias (BLAST) permitió asignarle identidad probable a 20 de los 55 ADNc aislados. Entre éstos se destacan genes cuyo producto está asociado a rutas metabólicas alternativas inducidas por la deficiencia de P (fosfoenolpiruvato carboxilasa), al sistema de rescate temprano activado en respuesta al estrés tanto en plantas como en microorganismos (fosfatasa y transportadores de fosfato de alta afinidad), al reciclaje de P desde membranas (sulfolípido sintasa), y a otros genes de función desconocida (ascorbato peroxidasa, proteína inducida por auxinas, acuapona, metiltransferasa, ubiquitina, entre otros)



**Figura 3.** "Differential display" de ARNm en respuesta a la disponibilidad de P. La figura muestra la expresión en ausencia de P (-), a las 24 y 72 h después de agregar 0,1 mM P (+), para dos combinaciones de partidores s/RT = control sin transcripción reversa

La estrategia utilizada también permitió identificar familias de genes que se expresan en raíces proteoideas, entre las que se incluyen fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCasa) y fosfatasa. Actualmente, nuestro trabajo está dirigido a asignarle identidad a ARNm desconocidos, y a estudios de funcionalidad de genes particularmente de aquellos que codifican para la enzima PEPCasa

## Conclusiones

Las raíces proteoideas de *L. albus* representan un tejido apropiado para estudiar la genómica del estrés por deficiencia de P en plantas. Este modelo está permitiendo identificar no sólo genes asociados con la respuesta generalizada de las plantas a este estrés, sino también con respuestas específicas de especies que utilizan la exudación de citrato como estrategia adaptativa.

## Bibliografía

- 1 Peñaloza et al., 2002. *Plant Soil* 241, 209-221
- 2 Peñaloza et al., 2002. *Physiol Plant*, 118 28-32
- 3 Ljung et al., 1994. *Nucl Acids Res* 22, 5363-5363

# EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE PROMOTORES DE TRANSPORTADORES DE FOSFATO DE ALTA AFINIDAD PARA DIRIGIR LA EXPRESIÓN DE GENES EN TRIGO

Haroldo Salvo-G<sup>1</sup>, Enrique Peñaloza<sup>1\*</sup>, Gastón Muñoz<sup>1</sup>, Luis Millas<sup>2</sup>, Cristina Neupert<sup>2</sup> y Herman Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biotecnología, INIA Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile; <sup>2</sup>Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, Departamento Biología, Universidad de Chile, 7800024 Nuñoa, Santiago, Chile. \*epenaloz@carillanca.inia.cl



GOBIERNO DE CHILE  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

## Introducción

Los transportadores de fosfato (Pi) de alta afinidad corresponden a proteínas de membrana que tienen por función transportar Pi desde el medio, con una afinidad 50-100 veces superior a aquellos que funcionan en condiciones de provisión no limitante de este nutriente.

De las dos familias de transportadores de Pi identificadas en plantas (Pht1 y Pht2), la familia Pht1 (transportadores de fosfato de alta afinidad) se ha estudiado extensivamente en Arabidopsis, donde a la fecha se han identificado nueve miembros. Estudios realizados con promotores de estos transportadores fusionados a genes reporteros indican que al menos dos de ellos se expresan predominantemente en raíces, en respuesta a la deficiencia de Pi.

En contraste con la evidencia acumulada en dicotiledóneas, se dispone de escasa información respecto a estudios análogos en monocotiledóneas. Sus características de inducibilidad por la deficiencia de Pi y su localización radical sugieren usos potenciales para dirigir la expresión de genes asociados con la respuesta de las

plantas a este estrés. En línea con esta hipótesis, se realizaron estudios con el objetivo de analizar la funcionalidad de promotores Pht1 para dirigir la expresión de genes que confieran tolerancia a la deficiencia de Pi en trigo.

## Metodología

Se estudiaron los promotores *AtPht1.1* (1,3 Kb) y *AtPht1.4* (1,4 Kb) de Arabidopsis, y *TaPht1.2* (0,5 Kb) de trigo fusionados al gen reportero *gus*, en un esquema de co-transformación con el gen de selección *bar* fusionado al promotor *ubi1* de maíz. Las construcciones se integraron en el genoma de trigo Bobwhite mediante biobalística (Pelligrineschi et al., 2000).

Las líneas transgénicas T<sub>0</sub> se seleccionaron en función a la tolerancia a herbicida Basta, y se analizaron molecularmente para confirmar la presencia del promotor de interés para el gen reportero *gus* y el gen de selección *bar*. En T<sub>1</sub> se realizaron análisis de progenie para determinar el número de loci integrados en el genoma del trigo. En T<sub>2</sub> se seleccionaron eventos independientes al estado homocigoto para cada construcción. La funcionalidad de los tres promotores se analizó en plantas T<sub>2</sub> mediante tinción histoquímica, RT-PCR y fluorometría.

## Resultados y Discusión

Se obtuvo aproximadamente 20% de eficiencia de co-transformación con el gen de selección y las construcciones de Interés.

Las generaciones T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> mostraron segregación mendeliana típica de 3:1, para ambos genes, evidenciando co-integración efectiva de los genes en un loci. La expresión de los tres promotores en líneas homocigotas T<sub>2</sub> no fue suficiente como para detectar actividad *Gus* a nivel histoquímico.

Sin embargo, los análisis de RT-PCR detectaron expresión de transcritos de *gus* para las construcciones con los promotores *AtPht1.1* (Fig. 1), *AtPht1.4* (Fig. 2) y *TaPht1.2* (Fig. 3). De acuerdo a estos resultados, en aproximadamente el 30% de los eventos se observó expresión de transcritos de *gus*. La cuantificación de la proteína *Gus* mediante fluorometría en eventos RT-PCR positivos detectó bajos niveles de actividad específica, fluctuante entre 0,2 y 1 pmol M<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> µg proteína<sup>-1</sup>. Esto explicaría por qué no se detectó tinción *Gus* a nivel histoquímico.

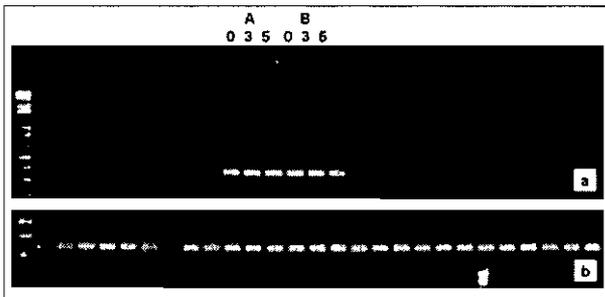


Figura 1(a) Expresión de transcritos de *gus* en análisis de RT-PCR en las líneas T<sub>2</sub> con construcción *AtPht1.1-gus*. A: IA287(2); y B: IA287(5), en tiempos de 0, 3 y 5 días de estrés (0: téstero). (b) Expresión de transcritos del gen ribosomal 28S utilizado como control interno.

La escasa funcionalidad de los promotores *AtPht1.1* y *AtPht1.4* en trigo podría atribuirse a la incapacidad para expresarse en genomas heterólogos. Aparte de un eventual silenciamiento, no se dispone de información que permita explicar la escasa funcionalidad de *TaPht1.2* en genomas homólogos.

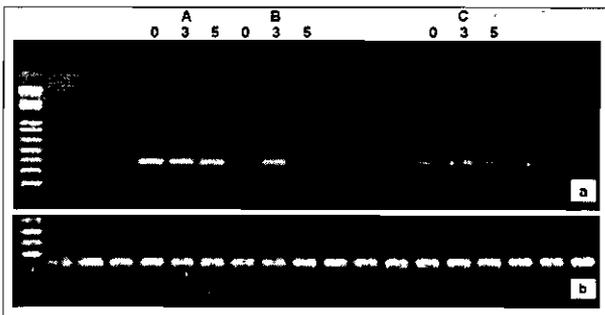


Figura 3(a) Expresión de transcritos de *gus* en análisis de RT-PCR en las líneas T<sub>2</sub> con construcción *TaPht1.2-gus*. A: IIA35(10), B: IIA52(1-11), y C: IIA144(11) a los 0, 3 y 5 días de estrés (0: téstero). (b) Expresión de transcritos del gen ribosomal 28S utilizado como control interno.

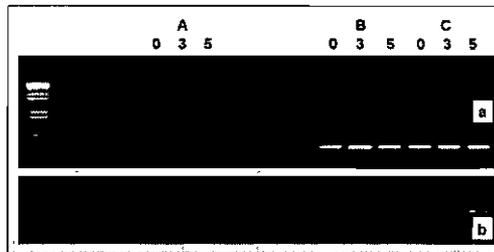


Figura 2(a) Expresión de transcritos de *gus* en análisis de RT-PCR en las líneas T<sub>2</sub> con construcción *AtPht1.4-gus*. A: IIA224(3); B: IA287(5); C: IIA292(2); y D: IIA3(3), en tiempos de 0, 3 y 5 días de estrés (0: téstero). (b) Expresión de transcritos del gen ribosomal 28S utilizado como control interno.

## Conclusiones

La fuerza promotora de *AtPht1.1*, *AtPht1.4* y *TaPht1.2* no fue suficiente para conferir niveles adecuados de expresión de *gus* en trigo Bobwhite sometido a estrés por deficiencia de Pi. Considerando evidencia reciente que demuestra que la expresión de transgenes en monocotiledóneas puede incrementarse significativamente mediante la adición de intrones (Schunmann et al., 2004), las construcciones se están complementando con la incorporación de un intrón de *Adh1*. Se espera que esta modificación incremente la expresión de transgenes modulados por Pi en trigo.

## Bibliografía

Pelligrineschi et al., 2000. Proceedings, La Estanzuela, Montevideo, Nov. 1998 pp 111-120.  
Schunmann et al., 2004. J Exp Bot. 55:855-865

## Agradecimientos

Trabajo financiado por el Fondo de Innovación Agraria (FIA, proyecto BIOT 01-A-36) Chile. Se agradece la colaboración de los doctores John Snape, John Innes Centre, U. K y Alessandro Pelligrineschi. ABC CIRMYT

# EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE PROMOTORES DE TRANSPORTADORES DE FOSFATO DE ALTA AFINIDAD EN TRIGO SOMETIDO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FOSFATO.

Espejel, F.<sup>1</sup>; Díaz, L.<sup>1</sup>; Peñaloza, E.<sup>1</sup>; Salvo-G, H.<sup>1</sup>; Muñoz, G.<sup>1</sup>; Silva, H.<sup>2</sup>; Neupert, C.<sup>2</sup>; Milla, L.<sup>2</sup>; Campillo, R.<sup>1</sup>; Corcuera, L.J.<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Biotecnología, INIA Carillanca, Temuco; <sup>2</sup>Universidad Andrés Bello, Santiago; <sup>3</sup>Universidad de Concepción, Concepción.

## RESUMEN

Los transportadores de fosfato de alta afinidad (Pht1) son proteínas de membrana inducidas en condiciones de deficiencia de fósforo (P) en plantas. Como tal, sus promotores son candidatos para dirigir la expresión de transgenes en respuesta específica a este estrés. Con el objetivo de definir el grado de estrés por deficiencia de P necesario para activar la expresión de genes modulados por promotores Pht1, se evaluaron los promotores de los genes *AtPht1;2* y *AtPht1;4* de *Arabidopsis* fusionados al gen reportero *gus*, e integrados en el genoma de trigo cv. Bobwhite. Los estudios se realizaron en plantas T<sub>2</sub> homocigotas crecidas en solución nutritiva con P y transferidas a solución nutritiva sin P, además de un suelo deficiente en este nutriente. Mediante qRT-PCR y tinción histoquímica, se demostró que la funcionalidad de estos promotores está asociada a la concentración de P en raíces. Particularmente, en suelo, se encontró que ambos promotores se expresan en forma similar a nivel de transcritos, pero sólo *AtPht1;4* evidenció tinción histoquímica. Estos resultados demuestran la funcionalidad de promotores de *Arabidopsis* en trigo, y sugieren la potencialidad, especialmente de *AtPht1;4*, como herramienta para expresar genes modulados sólo en respuesta a este estrés.

## INTRODUCCIÓN

Los transportadores de fosfato de alta afinidad corresponden a proteínas de membrana que tienen por función transportar P desde el medio, con una afinidad 50-100 veces superior a aquellos que funcionan en condiciones de provisión no limitante de este nutriente. Como consecuencia, la funcionalidad de estas proteínas adquiere particular relevancia en suelos con baja concentración de fósforo (1-5 µM).

De las dos familias de transportadores de fosfato identificadas en plantas (Pht1 y Pht2), la familia Pht1 (transportadores de fosfato de alta afinidad) se ha estudiado extensivamente en *Arabidopsis*, donde a la fecha se han identificado nueve miembros. En monocotiledóneas, en cambio, se dispone de escasa información respecto a estudios análogos sobre funcionalidad de promotores de este tipo de genes.

Las características de inducibilidad por la deficiencia de P y su localización radical sugieren usos potenciales de los promotores Pht1 de *Arabidopsis* para dirigir la expresión de genes asociados con la respuesta de las plantas a este estrés. En este trabajo se realizaron estudios con el objetivo de analizar la funcionalidad de dichos promotores en raíces de trigo.

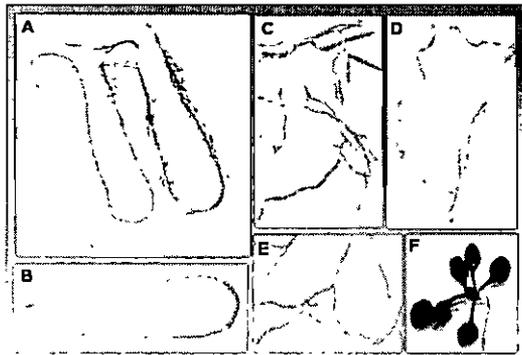


Figura 1. Tinción histoquímica de raíces de plantas transformadas con el gen *gus* fusionado al promotor *AtPht1;4* (A) Raíz de una planta cultivada en hidroponía durante 4 días en ausencia de P. (B) Detalle en aumento de la tinción GUS en la raíz de la planta cultivada en hidroponía durante 4 días en ausencia de P. (C) Raíz de una planta cultivada en suelo durante 2 días en ausencia de P. (D) Detalle en aumento de la tinción GUS en la raíz de la planta cultivada en suelo durante 2 días en ausencia de P. (E) Raíz de una planta cultivada en suelo durante 5 días en ausencia de P. (F) Planta completa cultivada en suelo durante 5 días en ausencia de P.

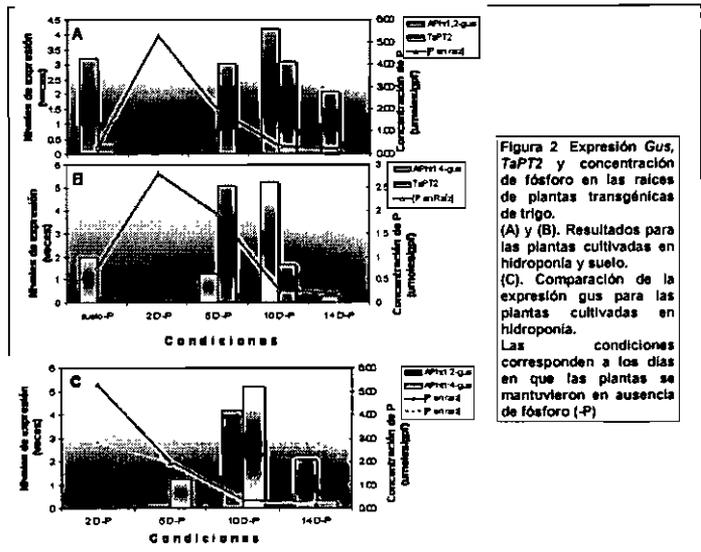
## METODOLOGÍA

Se evaluó la expresión de los promotores *AtPht1;2* (2,1 kb) y *AtPht1;4* (3 kb) de *A. thaliana* fusionados a *gus*. Las construcciones se integraron en el genoma de trigo Bobwhite mediante biobalística (1), en un esquema de co-transformación con la construcción *ubi1-bar*.

Líneas transgénicas T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> se establecieron en solución nutritiva con 0,1 mM Pi (+P) por siete días, trasplantándose posteriormente a solución nutritiva sin P (-P). Se mostraron plantas al momento del cambio de solución, y a los 2, 5, 10 y 14 días posteriores. Las plantas T<sub>3</sub> se establecieron en un suelo bajo en P (4 ppm) durante 45 días en condiciones de invernadero.

Las raíces de las plantas se sometieron a tinción histoquímica para revelar actividad GUS (2) y determinar la concentración de fósforo inorgánico (3).

Para los análisis mediante qRT-PCR, se diseñaron partidores para amplificar los genes *gus*, transportador de fosfato de trigo (*TaPT2*) y el gen ribosomal mitocondrial 26S. Se extrajo el RNA total de las raíces y se sintetizaron los cDNA previo tratamiento con DNase I. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron utilizando el kit SYBRGreen y un equipo MX3000P de Stratagene. La amplificación de cada gen se optimizó para establecer una eficiencia entre 90 y 100%. Los niveles de expresión de cada gen, bajo las diversas condiciones experimentales, se cuantificaron a través del método comparativo (2<sup>-ΔΔCt</sup>) usando el gen ribosomal 26S como gen de referencia, y la condición de cultivo hidroponico +P como condición control.



## RESULTADOS

### Tinción histoquímica.

En hidroponía, las plantas transformadas evidenciaron tinción GUS sólo en -P. Esto es, después de los 4 días del cambio de condición +P a -P. Sin embargo, la magnitud de la tinción fue baja, comparada con *Arabidopsis* transformada con la construcción 35S-*gus* (Fig. 1, A).

Por otro lado, se observó distribución heterogénea de la tinción en el tejido radical (Fig. 1, A, B). Esta situación podría estar relacionada con la especificidad celular de los promotores de *Arabidopsis* en una monocotiledónea.

En suelo, las plantas manifestaron tinción aún mas baja que la observada en hidroponía (comparar paneles A y B con C, D y E, Fig. 1). La construcción con el promotor *AtPht1;4* presentó la tinción más intensa en suelo.

Los experimentos de tinción se realizaron plantas T<sub>2</sub> y luego repetidos con plantas T<sub>3</sub>. En T<sub>3</sub> se observó puntos de tinción muy reducidos en extensión.

### Análisis de expresión mediante qPCR

En hidroponía, a los 2 días en -P, las raíces contienen suficiente fósforo como para no permitir la expresión de genes regulados por este nutriente. En efecto, el gen *TaPT2* no incrementó su expresión sino hasta los 5 y 10 días, cuando el P disminuyó a niveles basales. Esto coincidió con un incremento de la expresión de *gus* para ambos promotores, la que se redujo a los 14 días (Fig. 2, A, B).

El promotor *AtPht1;4* presentó una mayor expresión que *AtPht1;2* a los 5 días en ausencia de P (Fig. 2 C), sugiriendo que *AtPht1;4* sería menos sensible a la disponibilidad de P para inducir su expresión.

En suelo, se detectó expresión *gus* similar y comparable a lo observado a los 5 y 10 días en hidroponía en ausencia de P, para ambos promotores (Fig. 2, A, B). Notablemente, la expresión del gen *TaPT2* fue menor al compararlo con lo mostrado en hidroponía.

## CONCLUSIONES

- Se demostró expresión *gus* modulada por los promotores de *Arabidopsis* en plantas de trigo mantenidas bajo condiciones de deficiencia fósforo, tanto en hidroponía como en suelo.
- Aun cuando la expresión de transcritos observada en las plantas cultivadas en suelo fue comparable para ambos promotores, sólo *AtPht1;4* evidenció tinción histoquímica
- Nuestros resultados indican que, de los promotores evaluados, *AtPht1;4* sería adecuado para introducir genes de interés en trigo, modulados por la deficiencia de fósforo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Paillereschil y cols., 2000. *Proceedings*, La Estanzuela, Montevideo, Nov 1998 pp. 111-120.
- Jefferson y cols., 1987. *EMBO J*, 6, 3901-3907.
- Ames, B.N., 1966. *Method Enzymol* 1: 118-119.

Trabajo financiado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) a través del proyecto BIOT 01-A-36.



RESEARCH PAPER

# Phosphate deficiency regulates phosphoenolpyruvate carboxylase expression in proteoid root clusters of white lupin

Enrique Peñaloza<sup>1,\*</sup>, Gastón Muñoz<sup>1</sup>, Haroldo Salvo-Garrido<sup>1</sup>, Herman Silva<sup>2</sup> and Luis J. Corcuera<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Unidad de Biotecnología, INIA Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile

<sup>2</sup> Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, Millennium Nucleus in Plant Cell Biology P02-009-F, Departamento de Biología, Universidad de Chile, 7800024 Nuñoa, Santiago, Chile

<sup>3</sup> Departamento de Botánica, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile

Received 25 June 2004; Accepted 13 August 2004

## Abstract

Proteoid roots play a major role in enabling white lupin (*Lupinus albus* L.) to adapt to phosphate (Pi) deficiency. Such roots release citrate from proteoid rootlets, which allows this species to mobilize Pi from sparingly soluble Pi sources. Release of citrate is preceded by a significant accumulation of organic acids, in which a Pi deficiency-inducible phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) activity has been involved. To gain an insight into this adaptive mechanism, the expression of three different transcripts coding for PEPC was examined in proteoid rootlets of Pi-starved and Pi-starved-and-rescued white lupin. Semi-quantitative reverse transcriptase (RT)-PCR experiments performed with gene-specific primers targeted to the 3'-end region of the corresponding cDNAs revealed that the transcripts for these three PEPCs differentially accumulate in both Pi-starved and Pi-starved-and-rescued proteoid rootlets. Semi-quantitative RT-PCR analysis in Pi-starved proteoid rootlets sampled at different times after being rescued from Pi deficiency showed that Pi levels differentially down-regulated the three PEPC transcripts. RT-PCR experiments were further extended to Pi-starved and Pi-fed whole roots, cotyledons, and leaves on which a tissue-specific, Pi-dependent PEPC expression was observed. These results indicate that there exists at least three different transcripts coding for PEPC in proteoid root clusters of white lupin, whose expression are differentially regulated by Pi.

Key words: *Lupinus albus*, PEPC activity, PEPC expression, proteoid rootlets.

## Introduction

A plant's response to phosphate (Pi) deficiency involves a series of co-ordinated morphological, physiological, and metabolic changes that enable the plant to adapt to this unfavourable condition, thereby increasing its survival (Raghothama, 1999). Such changes have been shown to occur in white lupin (*Lupinus albus* L.), in which the foremost morphological adaptation to Pi deficiency is the development of proteoid roots (Gardner *et al.*, 1981). Proteoid roots are entire primary lateral roots that develop one or more clusters of rootlets along their axes (Watt and Evans, 1999a, b). In this species, proteoid roots accumulate citrate, which is subsequently released into the rhizosphere of Pi-starved plants (Keerthisinghe *et al.*, 1998; Neumann *et al.*, 1999; Peñaloza *et al.*, 2002a). Citrate release increases the bioavailability of Pi within the rhizosphere, thereby providing the white lupin with additional soluble Pi (Gardner *et al.*, 1982).

The accumulation of citrate in proteoid roots is accompanied by metabolic changes induced by Pi deficiency that alter the activity of several enzymes involved in organic acid synthesis and catabolism (Johnson *et al.*, 1994, 1996b; Neumann *et al.*, 1999, 2000). One such enzyme is phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31). This enzyme plays a major role as an anaplerotic carbon source for the biosynthesis of organic acids in response to Pi

\* To whom correspondence should be addressed. Fax: +56 45 216112. E-mail: epenaloz@carillanca.inia.cl

## A

```

LaPEPC1          ctttactctctcctccaatttcttgggtctcataaacttactcttctta
LaPEPC2          .....
LaPEPC3          gaaaaaccccttgattttaggctcatagttctttttatttggatttgg...t.ca.t.tg.gttga.....ct...tt ct.t...gg...t...tt.t
LaPEPC4          catggactgaaggagttagaaaatcaatc-----g.at...atctttg...c.a...tt...atc cctttgact...ta.t...c

```

```

LaPEPC1          tccaaccttggcccttactcag-----gtgaagggtgagtgaaaggttacaATGGCGA-----ACAGGAAC TTGGAAA
LaPEPC2          .....
LaPEPC3          at..ttg..ag..tg.aaa ct.tg.ttgatttttgatgttcaca..tg.a...C...aag..ac..aa.aATGGCAAACA.T...A.....
LaPEPC4          ct.gta..a c.....g-----ca..tg.a.g.....ag.t..aa.aATGGCAAGCA.T...A.....

```

## B

```

LaPEPC1          TCCGTGATCCGAACACTACGATGTGAAGTTGCGCCCCACATCTCGAAGAGTGTATCGAGATAAGTAAAGTTGCTGATGAACCTTATAACACTGAACCCAAC
LaPEPC2          .....
LaPEPC3          .T...C.....TTA...CC.CCT...T.T.....T.A.C.G...A.....TC...AC.....G..T.....
LaPEPC4          .T.....TTA.C...CG.CC...A...T.....C.T.G...A...C.TCA...AC.....G..T.....

```

```

LaPEPC1          AAGTGAATATGCTCCTGGTTTGGAAAGACACCTTCATCCTCACCATGAAGGGTATTGCTGCTGGACTTCAGAACCACCGTTAAaccggagtttctgtatct
LaPEPC2          .....C.....G.....TAA.....C..C...
LaPEPC3          .....A.....T.C...T...T.A.....CA.G.....T...TAA-----taaa.t.ag.t.
LaPEPC4          .....C.....T.TC...T.....CA.G.....T...TAA.ta.ttaa.t.cagctc

```

```

LaPEPC1          tattttatttctctgtttcttgcatcaagcctttctagagatcataaattctagttgcaaccaccaaaagtggtgctaggtgttctctttatgatcacca
LaPEPC2          .C.....
LaPEPC3          a..gctt...t.a.at..t.t---t...C.C.a.....g-----ct...tag...c-ttac.a.gt.c.tat...a.t
LaPEPC4          ac.gcat..a...t.g.at..t.t---t...g.c.a.....a...c...ctt...cag..tc.tt.t.a.gt.c.tat...a.t

```

```

LaPEPC1          taaggataagtatatttcttactttgctgtataatgtaattgggttgagcttgaattccgaagtgatagctgccacagatgatgaatgtgtgtatgt
LaPEPC2          .....
LaPEPC3          .tttt...ct-----g.ta...t.a.at.t.c.gcac.ttg.a..ac.ata...t.gttat.tat..tt.aag.ttc.a..aca...ata..aa..a..
LaPEPC4          .ttaa.g.c-----tgct.c.ctaaaga...ctact..a.ca...a.t...a.atga.c.aa.a.c.at.

```

```

LaPEPC1          aactgttcgttacatttcaataaagaactatgttgcgtatcacttgtttccagctactatgaattaaaacagcactcttatatttgatgtatgcagtgtg
LaPEPC2          .....
LaPEPC3          .ctac..gtg...t...tgt..t-----
LaPEPC4          ..tca..atg.tttcaatgc.g.a-----t.....ag.

```

```

LaPEPC1          ttacatagttacaatttgggaaggaatgtgagatatttatggatgac-----aaaaaaaaaaaaa
LaPEPC2          .....tgtagttcaacatcg.....aaa
LaPEPC3          .....
LaPEPC4          .....aaa

```

**Fig. 1.** Partial alignment of *LaPEPC2*, *LaPEPC3*, and *LaPEPC4* 5'-end (A) and 3'-end (B) cDNA sequences. Conserved nucleotides are indicated by a dot, and gaps introduced for alignment purposes by a dash. Untranslated 5'-end and 3'-end regions are shown in lower case whereas coding regions are in upper case lettering. *MboI*, *MseI*, and *DpnI* used to demonstrate primers specificity are indicated below their corresponding restriction sites. Nucleotides encoding the initiator codon and the stop codon are shown in bold letters. The location of gene-specific primers used for RT-PCR is marked with arrows indicating polarity 5 to 3. The motif QNTG is indicated above the nucleotide sequence. Partial alignment of *LaPEPC1* (accession AF459644) is included on (A) and (B). The nucleotide sequence of *LaPEPC2*, *LaPEPC3*, and *LaPEPC4* cDNAs were deposited in the GenBank under the accession numbers AY663386, AY663387 and AY663388, respectively.

(pLaPEPC4) cDNAs, and by digesting the amplified PCR products with *MboI*, *MseI*, and *DpnI*. The DNA methylation-dependent *DpnI* was used as a negative control of digestion. The restriction sites along the sequence of the three PEPC cDNAs for *MboI*, *MseI*, and *DpnI* are indicated in Fig. 1B. Control experiments showed that the selected primers specifically amplified a nucleotide sequence of the expected size for identifying *LaPEPC2* (346 bp), *LaPEPC3* (249 bp), and *LaPEPC4* (228 bp). These three products correspond to different unique cDNAs since no cross amplification with the gene-specific set of primers was observed (Fig. 2A). Likewise, restriction enzyme analysis shows the expected digestion pattern, demonstrating the specificity of the primer sets (Fig. 2B). Cyclophilin, a gene that does not change its expression pattern under the conditions analysed, was used as an internal control in the semi-quantitative RT-PCR experi-

ments. A 194 bp fragment of cyclophilin was amplified using primers 5'-AAAACCTAAACGAAGAC-3' and 5'-GTGAGGGACATAGA-GAAG-3'.

PCR reactions were performed in a final volume of 30  $\mu$ l containing 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM each dNTP, 1.5 units *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 40 ng of cDNA template and 0.2  $\mu$ M of each primer. PCR reactions were conducted at 94 °C for 5 min to denature the RT product, followed by 16–30 PCR cycles of 94 °C for 40 s, 54 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, and a 5 min final extension step at 72 °C. PCR products were separated on 1.8% (w/v) agarose gels and visualized by ethidium bromide staining. No amplification products were detected with the specific primer sets when DNaseI-treated RNA was used as the template, confirming that the results of the semi-quantitative reactions represent mRNA transcript levels.

**Table 1.** Characteristics of the full-length PEPC cDNAs isolated from Pi-starved proteoid rootlets of white lupin

PEPC cDNAs	GenBank accession	Full-length (bp)	Coding region (bp)	Identity coding region (%)		3'-UTR (bp)	Identity 3'-UTR (%)		5'-UTR (bp)	Identity 5'-UTR (%)	
				<i>LaPEPC3</i>	<i>LaPEPC4</i>		<i>LaPEPC3</i>	<i>LaPEPC4</i>		<i>LaPEPC3</i>	<i>LaPEPC4</i>
<i>LaPEPC2</i>	AY663386	3404	2904	87.7	87.3	397	27.3	32.2	103	32.9	45.7
<i>LaPEPC3</i>	AY663387	3320	2907		93.2	239		60.2	174		45.5
<i>LaPEPC4</i>	AY663388	3288	2907			248			133		

products specific for each of the three PEPC transcripts were within the linear range of amplification (Fig. 3A, B). These results indicate that the relationship between the transcript levels of the PEPC genes changes with changes in Pi availability. Similar quantities of amplified products of *LaPEPC3* and *LaPEPC4* in Pi-starved proteoid rootlets were obtained at 20 PCR cycles, whereas four more cycles were needed to reach equivalent quantities for *LaPEPC2*. Accordingly, 24, 20, and 20 PCR cycles were used for studying *LaPEPC2*, *LaPEPC3*, and *LaPEPC4* expression further, along with 22 PCR cycles for cyclophilin. Under these conditions, the absence of an amplification product was interpreted as a lack of or undetectable gene expression in the treatments and tissues being analysed. At 22 cycles of PCR amplification, cyclophilin mRNA was detected in all tissues and Pi treatments, thereby confirming that cyclophilin gene expression is not significantly affected by Pi (Peñaloza *et al.*, 2002b) and may, therefore, be used as an internal control for the RT-PCR reactions.

To examine the causal relationship between PEPC expression and Pi supply, semi-quantitative RT-PCR was performed in proteoid rootlets sampled at different times after adding 0.1 mM Pi. Results from this analysis demonstrate additional differences in the accumulated transcript levels between the PEPCs (Fig. 4A). The addition of exogenous Pi was reflected in the proteoid rootlets as an increase in the Pi content within this tissue (Fig. 4B). As Pi increases from 1.1 to 3.3  $\mu\text{mol Pi g}^{-1}$  fresh weight, *LaPEPC3* and *LaPEPC4* were differentially repressed while *LaPEPC2* appears unaffected. A further increase to 11.6  $\mu\text{mol Pi g}^{-1}$  fresh weight at 24 h did not affect the expression of *LaPEPC2* and *LaPEPC4* transcripts. However, *LaPEPC4* was strongly repressed 72 h after applying exogenous Pi, even though no significant difference in the steady-state of endogenous Pi was detected. This response to exogenously applied Pi indicates that subsequent alterations in endogenous Pi levels affect *LaPEPC3* expression significantly, whereas both *LaPEPC2* and *LaPEPC4* were less responsive to changes in Pi content within the tissue.

In order to determine tissue-specific differences in the transcript levels of the three PEPCs, semi-quantitative RT-PCR experiments were extended to different plant tissues. Transcripts of *LaPEPC2* were detected in whole roots and leaves, whereas transcripts of *LaPEPC3* and *LaPEPC4* accumulated at very low levels, primarily in Pi-starved tissues (Fig. 5A, C). Running PCR cycles at near saturation

(26 cycles of amplification) also showed detectable *LaPEPC2* transcripts in cotyledons of both Pi-starved and Pi-fed tissues. Under these PCR conditions, *LaPEPC3* and *LaPEPC4* transcripts were detected at significant levels in whole roots and Pi-starved leaves but not in cotyledons and Pi-fed leaves (Fig. 6B, C). This tissue-specific expression is further evidence that the three PEPC transcripts differ from each other.

#### PEPC activity in proteoid root clusters

In order to correlate PEPC expression with PEPC activity in mature proteoid root clusters, specific PEPC activity was assayed in the same tissues used for RT-PCR analyses. As expected, the highest specific activity was observed in Pi-starved proteoid rootlets, whereas it was reduced by 45% in Pi-starved proteoid root axes (Fig. 6). In order to determine how much of this activity is affected by Pi supply, PEPC activity was measured in rootlets and axes at 8, 24, and 72 h after adding 0.1 mM Pi to 21-d-old Pi-starved plants. PEPC activity remained essentially constant in Pi-starved proteoid rootlets, whereas it was significantly reduced by exogenous Pi, but only in Pi-starved-and-rescued proteoid rootlets. In these experiments, Pi concentration in leaves of Pi-starved-and-rescued plants increased from  $1.6 \pm 0.6 \mu\text{mol g}^{-1}$  fresh weight to the level of Pi-fed plants ( $29 \pm 3.6 \mu\text{mol g}^{-1}$  fresh weight) within 24 h after exogenous Pi was supplied.

#### Discussion

Proteoid roots are a suitable model tissue to examine gene expression in response to Pi starvation in white lupin (Massonneau *et al.*, 2001; Peñaloza *et al.*, 2002b; Uhde-Stone *et al.*, 2003a, b). Studies on such roots allowed the identification of a partial PEPC cDNA, which represents a gene that is preferentially expressed in Pi-deficient proteoid rootlets (Peñaloza *et al.*, 2002b). By using this cDNA as probe, three different full-length PEPC cDNAs were isolated. All three cDNAs encode the highly conserved QNTG plant motif at the C terminal of the deduced protein, which indicates that none of them correspond to the PEPC of bacterial origin recently reported in *Arabidopsis* (Sánchez and Cejudo, 2003). These PEPC cDNAs share high nucleotide identity within the coding region. However, their corresponding 5'-UTRs and 3'-UTRs differ in nucleotide sequence and length (Table 1; Fig. 1). Since 3'-UTRs may

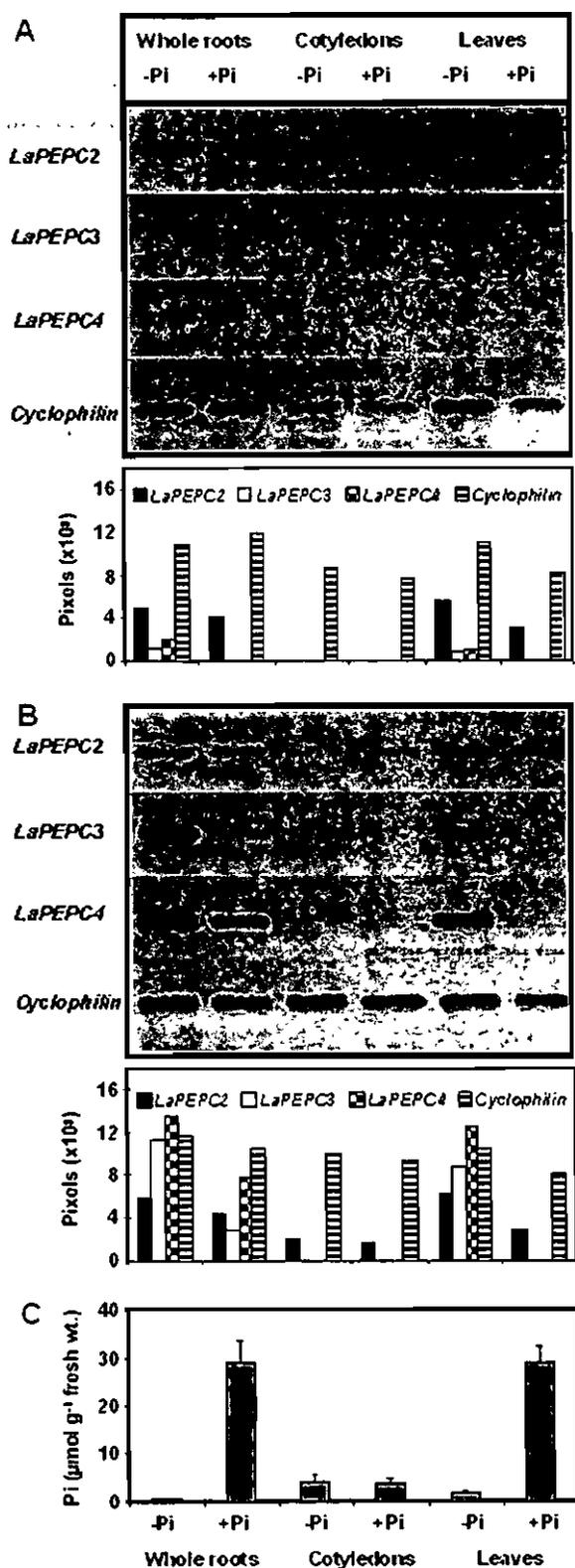


Fig. 5. Semi-quantitative RT-PCR analysis of *LaPEPC2*, *LaPEPC3*, and *LaPEPC4* transcripts in whole roots, cotyledons, and leaves from Pi-starved (-Pi) and Pi-fed (+Pi) white lupin using gene-specific primers for each cDNA. Cotyledons were sampled from 3-d-old plants whereas whole roots and leaves were from 24-d-old plants. Ethidium bromide-stained gels of PCR products amplified under standard conditions and at

near saturation are shown in (A) and (B), respectively. Cyclophilin serves as the internal control. The minus RT control is not included. Signal intensity of the amplification products assessed by digitalized analysis of ethidium bromide-stained gels is shown at the bottom of (A) and (B). (C) Inorganic phosphate (Pi) content of each tissue at the time of sampling. Each Pi value represents the mean  $\pm$ SD of four replicates.

between *LaPEPC2*, *LaPEPC3* and *LaPEPC4* transcripts by northern hybridization (not shown). Therefore, the expression of the three PEPCs was addressed by performing RT-PCR with gene-specific primers targeted to the divergent 3'-end region of the corresponding cDNAs. Semi-quantitative RT-PCR analyses carried out in proteoid rootlets revealed a pattern of mRNA accumulation that differentiated the three PEPC transcripts from each other. An obvious difference under Pi deficiency was the comparatively high levels of *LaPEPC3* and *LaPEPC4*, whereas a striking difference under Pi sufficiency was the strong effect of Pi supply in down-regulating *LaPEPC3* (Fig. 3). Sampling at different times after Pi supply demonstrated that the timing of down-regulation for the three PEPC transcripts was dependent on Pi content in tissues (Fig. 4). Although down-regulation of *LaPEPC2* and *LaPEPC4* transcripts by Pi seems to follow what would be expected for a Pi-dependent gene expression (Martin *et al.*, 2000; Abel *et al.*, 2002), the timing of down-regulation of *LaPEPC3* precedes the increase in Pi content in the tissue. This would suggest that Pi itself does not seem to be involved in modulating the response of *LaPEPC3* transcripts, as observed for several Pi-starvation-inducible genes which are systemically repressed in roots well before these roots reach a high Pi level (Burleigh and Harrison, 1999). These patterns of PEPC regulation in proteoid rootlets mimic what has been observed for phosphatases and Pi transporter genes, whose expression depends on differential sensitivity to changing Pi concentration in the medium (Baldwin *et al.*, 2001; Mukatira *et al.*, 2001; Kai *et al.*, 2002).

Because of the various physiological roles that have been postulated for C<sub>3</sub> PEPC in higher plants (Latzko and Kelly, 1983), it may be expected that a constitutive expression of PEPCs in many tissues is necessary. This criterion was met by the *LaPEPC2* transcript, whereas *LaPEPC3* and *LaPEPC4* were barely detectable in tissues other than proteoid rootlets (Fig. 5A). Although at a low level, *LaPEPC3* and *LaPEPC4* were expressed in leaves of Pi-starved plants, which suggest that the three PEPC gene products might be involved in organic acid synthesis, not only in proteoid roots but also in the aerial part of the plant. It is known that shoots accumulate large amounts of malate (Peñaloza *et al.*, 2002a), and that about one-third of C released as root exudates by Pi-starved white lupin comes from shoots (Johnson *et al.*, 1996a). Accordingly, PEPC gene products in leaves may contribute to a portion of the

- Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 273–298.
- Gardner WK, Parbery DG, Barber DA.** 1981. Proteoid root morphology and function in *Lupinus albus*. *Plant and Soil* **60**, 143–147.
- Gardner WK, Parbery DG, Barber DA.** 1982. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. Some characteristics of the soil/root interface. *Plant and Soil* **68**, 19–32.
- Graber JH, Cantor CR, Mohr SC, Smith TF.** 1999. *In silico* detection of control signals: mRNA 3' end-processing sequences in diverse species. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96**, 14055–14060.
- Hoffland E, van del Boogaard R, Nelemans J, Findenegg G.** 1992. Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants. *New Phytologist* **122**, 675–680.
- Ingelbrecht ILW, Herman LMF, Dekeyser RA, Van Montagu MC, Depicker AG.** 1989. Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cells. *The Plant Cell* **1**, 671–680.
- Johnson JF, Allan DL, Vance CP.** 1994. Phosphorus stress-induced proteoid roots show altered metabolism in *Lupinus albus*. *Plant Physiology* **104**, 657–665.
- Johnson JF, Allan DL, Vance CP, Weiblen G.** 1996a. Root carbon dioxide fixation by phosphorus-deficient *Lupinus albus*. Contribution to organic acid exudation by proteoid roots. *Plant Physiology* **112**, 19–30.
- Johnson JF, Vance CP, Allan DL.** 1996b. Phosphorus deficiency in *Lupinus albus*. Altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiology* **112**, 31–41.
- Johnson MA, Baker EJ, Colbert JT, Green PJ.** 1998. Determinants of mRNA stability in plants. In: Bailey-Serres J, Gallie DR, eds. *A look beyond transcription: mechanisms determining mRNA stability and translation in plants*. American Society of Plant Physiologists, 40–53.
- Kai M, Takazumi K, Adachi H, Wasaki J, Shinano T, Osaki M.** 2002. Cloning and characterization of four phosphate transporter cDNAs in tobacco. *Plant Science* **163**, 837–846.
- Keerthisinghe G, Hocking PJ, Ryan PR, Delhaize E.** 1998. Effect of phosphorus supply on the formation and function of proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant, Cell and Environment* **21**, 467–478.
- Latzko E, Kelly GL.** 1983. The many-faceted functions of phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>3</sub> plants. *Physiologie Végétale* **21**, 805–815.
- Martín AC, del Pozo JC, Iglesias J, Rubio V, Solano R, de la Peña A, Leyva A, Paz-Ares J.** 2000. Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **24**, 559–567.
- Massonneau A, Langlade N, Leon S, Smutny J, Vogt E, Neumann G, 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.
- Mukatira UT, Liu C, Varadarajan DK, Raghothama KG.** 2001. Negative regulation of phosphate starvation-induced genes. *Plant Physiology* **127**, 1854–1862.
- Murphy J, Riley JP.** 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* **27**, 31–36.
- Neumann G, Massonneau A, Langlade N, Dinkelaker B, Hengeler C, Römheld V, Martinoia E.** 2000. Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus-deficient white lupin (*Lupinus albus* L.). *Annals of Botany* **85**, 909–919.
- Neumann G, Massonneau A, Martinoia E, Römheld V.** 1999. Physiological adaptation to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* **208**, 373–382.
- Peñaloza E, Corcuera LJ, Martínez J.** 2002a. Spatial and temporal variation in citrate and malate exudation and tissue concentration as affected by P stress in roots of white lupin. *Plant and Soil* **241**, 209–221.
- Peñaloza E, Gutierrez A, Martínez J, Muñoz G, Bravo L, Corcuera LJ.** 2002b. Differential gene expression in proteoid root clusters of white lupin (*Lupinus albus*). *Physiologia Plantarum* **116**, 28–36.
- Pilbeam DJ, Cakmak I, Marschner H, Kirkby EA.** 1993. Effect of withdrawal of phosphorus on nitrate assimilation and PEP carboxylase activity in tomato. *Plant and Soil* **154**, 111–117.
- Raghothama KG.** 1999. Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 665–693.
- Sambrook L, Fritsch E, Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez R, Cejudo FJ.** 2003. Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology* **132**, 949–957.
- Uhde-Stone C, Gilbert G, Johnson JM-F, Litjens R, Zinn KE, Temple SJ, Vance CP, Allan D.** 2003b. Acclimation of white lupin to phosphorus deficiency involves enhanced expression of genes related to organic acid metabolism. *Plant and Soil* **248**, 99–116.
- Uhde-Stone C, Zinn KE, Ramirez-Yáñez M, Li A, Vance CP, Allan DL.** 2003a. Nylon filter arrays reveal differential gene expression in proteoid roots of white lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant Physiology* **131**, 1064–1079.
- Watt M, Evans JR.** 1999a. Linking development and determinacy with organic acid efflux from proteoid roots of white lupin grown with low phosphorus and ambient or elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Plant Physiology* **120**, 705–716.
- Watt M, Evans JR.** 1999b. Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiology* **121**, 317–323.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

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

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. Gus fusion beta glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901-3907.

Mudge SR, Rae AN, Diatloff E, Smith FW. 2002. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant J.* 31:341-353.

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

Peñaloza E, Gutierrez A, Martínez J, Muñoz G, Bravo L, Corcuera LJ. 2002. Differential gene expression in proteoid root clusters of white lupin (*Lupinus albus*). *Physiol. Plant.* 241:209-221.

Peñaloza E, Muñoz G, Salvo-Garrido H, Silva H, Corcuera LJ. 2005. Phosphate deficiency regulates phosphoenolpyruvate carboxylase expression in proteoid root clusters of white lupin. *J. Exp. Botany* 409: 145-153.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Second edition, Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schunmann PHD, Richardson AE, Smith FW, Delhaize M. 2004. Characterization of promoter expression pattern derived from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 398: 855-856