GOBIERNO DE CHILE
MINISTERIO DE AGRICULTURA
FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

GOBIERNO DE CHILE
MINISTERIO DE AGRICULTURA
INIA LA - PLATINA

Desarrollo de un sistema de trazabilidad molecular y de evaluación del impacto sobre la biodiversidad local de plantas genéticamente modificadas a través de transgenia

INFORME TÉCNICO FINAL
PROYECTO BIOT 01-A-014
Mayo 2006

TABLA DE CONTENIDOS

I. ANTECEDENTES GENERALES 3
II. RESUMEN EJECUTIVO 4
1. Características de la Propuesta. 5
1.1. Resumen original de la propuesta. 5
1.2. Plan operativo y sus modificaciones. 5
2. Resultados. 6
2.1. Resultados obtenidos. 6
3. Aspectos metodológicos. 7
3.1. Metodología. 7
3.1.1. Sistema de *Brassica* spp. 7
3.1.2. Sistema de *Zea mays* 17
3.1.3. Sistema *Solanaceae* spp. 21
3.1.4. Trazabilidad de semillas. 23
3.1.5. Programa APLAC T034. 27
3.2. Problemática encontrada y adaptación de metodologías. 33
3.3. Actividades y tareas ejecutadas para la consecución de los objetivos. 33
4. Resultados del proyecto por objetivos. 34
4.1. Desarrollar un sistema de trazabilidad de material tipo GMO ingresado al país. 34
4.2. Desarrollar un sistema de evaluación del impacto de plantas transgénicas importadas y desarrolladas en el país sobre especies silvestres relacionadas de interés nacional. 36
4.2.1. Sistema de *Brassica* spp. 36
4.2.2. Sistema de *Zea mays.* 40
4.2.3. Sistema de *Solanum* spp. 47
5. Perspectivas del rubro luego del proyecto. 51
6. Problemas enfrentados durante la ejecución del proyecto (legales, técnicos, administrativos, de gestión) y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos. 52
7. Calendario de ejecución (programado, real) y cuadro resumen de costos (programados, efectivos) del proyecto. 52
8. Difusión de los resultados obtenidos. 55
9. Impactos del proyecto. 55
9.1. Impactos y logros: cuadros sintéticos. 56
9.1.1. Impactos Productivos, Económicos y Comerciales 56
9.1.2. Impactos Sociales 57
9.1.3. Impactos Tecnológicos 58
9.1.4. Impactos Científicos 60
9.1.5. Impactos en Formación 62
10. Discusión final, conclusiones y recomendaciones. 63
11. Bibliografía Consultada. 67
12. Anexos. 70

I. ANTECEDENTES GENERALES

Nombre del Proyecto:
Desarrollo de un sistema de trazabilidad molecular y de evaluación del impacto sobre la biodiversidad local de plantas genéticamente modificadas a través de transgenia.

Código:
BIOT 01-A-014

Regiones:
Metropolitana a la IX

Fecha de aprobación o adjudicación:
Diciembre de 2001

Forma de Ingreso al FIA:
Concurso - Biotecnología

Agente Ejecutor y Asociados:
Ejecutor: Instituto de Investigaciones Agropecuarias
Asociado: Servicio Agrícola y Ganadero.

Coordinador del Proyecto:
Humberto Prieto Encalada

Costo Total:
$ **179,925,424**

Aporte del FIA (en pesos; porcentaje del costo total)
$ **106,416,297**

Período de Ejecución:
Diciembre 2001- Diciembre 2005

II. RESUMEN EJECUTIVO

i. **Contexto.**

El proyecto se planificó y desarrolló en un concierto global nacional e internacional de gran debate sobre el efecto de la agricultura transgénica en el medioambiente y la salud humana. En esa línea, la idea básica fue desarrollar estudios concretos que permitieran comprender, estudiar y sentar las capacidades, para dimensionar de una manera técnica, el recurrente concepto "flujo génico desde cultivos genéticamente modificados (GM) hacia las otras plantas".

ii. **Objetivos.**

Los objetivos iniciales fueron: a) evaluación del flujo génico en campo, b) evaluación del flujo génico en el mercado de semillas (trazabilidad) y c) informar a la opinión pública. Los objetivos finales alcanzados correspondieron a: a) evaluación del flujo génico en campo, b) desarrollo de metodologías particulares para la trazabilidad de semillas, c) desarrollo de un sistema base para el modelamiento matemático de impacto ambiental y c) nuevos sistemas moleculares aplicables a la detección de híbridos de campo.

iii. **Impacto efectivo y logros.**

La información corrientemente emanada desde este proyecto permitió a los organismos reguladores relacionados con el tema, SAG y CALT, reforzar de manera pro-activa, las medidas técnicas utilizadas y exigidas en el sistema de aprobación de eventos GM para multiplicación (en el caso del material de semilla importada) o evaluación (en el caso de especies GM desarrolladas en Chile (vides y frutales de carozo)). De esta forma, los logros del presente proyecto se pueden resumir en: a) generación de un núcleo con experiencia en flujo génico de plantas, b) un grupo de trabajo con gran experiencia en trazabilidad de semillas, c) base de datos y sistema de modelamiento básico y d) información técnica para publicación y patentamiento.

1. Características de la Propuesta.

1.1. Resumen original de la propuesta.

La incorporación de los cultivos genéticamente modificados por transgenia ha obligado a la reformulación de los sistemas de evaluación y análisis de riesgos relacionados con el efecto sobre la biodiversidad, comúnmente llamados sistemas de bioseguridad. En el actual contexto, la política de Chile es el alineamiento dentro de los bloques comerciales internacionales, lo que implica la firma, ratificación y finalmente el cumplimiento, de los acuerdos internacionales estipulados por la Organización Mundial del Comercio, el Codex Alimentarius y el Convenio de Biodiversidad Biológica. Esta ratificación de membrecía, implica que Chile deberá presentarse ante la comunidad internacional como un componente con capacidad de definición frente a determinados eventos relacionados con la producción, internación y consumo de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) o de sus derivados (*commodities*). Para enfrentar este conjunto de decisiones, es absolutamente indispensable que cada país posea centros con capacidad técnica de evaluación de los eventuales riesgos que implicarían la adopción de determinados productos transgénicos desarrollados en centros de investigación extranjeros o nacionales, concentrados no sólo en la detección de estos organismos con el fin de manipularlos con preservación de su identidad (segregación) y verificando su condición de OGMs, sino también evaluando el real impacto sobre los componentes cotidianos de nuestro ecosistema (humanos, animales y plantas). De esta forma, el presente proyecto tiene como objetivo general la generación y establecimiento de un sistema de análisis de OGMs en el país, el que se percibe como un conjunto de dos componentes, la trazabilidad molecular de los OGMs (especialmente de los importados) y el impacto de estos sobre la biodiversidad silvestre y agrícola propia. De la misma forma, una vez establecida esta capacidad técnica, se formula su transferencia hacia los organismos reguladores específicos (específicamente al Servicio Agrícola y Ganadero, SAG), como una estrategia de implementación rápida de, al menos, las primeras etapas de evaluación de los embarques importados (trazabilidad molecular).

1.2. Plan operativo y sus modificaciones.

Operativamente, el proyecto se dividió en tres componentes: a) trazabilidad molecular, b) evaluación del flujo génico en campo y c) extensión de los resultados derivados del estudio.
En forma esencial, el objetivo a) se planificó como transferible hacia el final del proyecto hacia el SAG; mientras b) se desarrolló con miras llenar un espacio técnico sobre la cuantificación del efecto de la siembra de semilleros GM en la agricultura local. El objetivo c) se pensó como una forma eficiente de vincular al sector interesado (semilleros) y a la percepción pública en general, con datos de la realidad de los cultivos GM en campo.
La planificación original fue modificada de forma de desarrollar solamente los dos primeros objetivos. Para esto, se potenció el equipamiento del proyecto, considerando eventuales necesidades de un flujo mediano de muestras procesadas tanto en la línea de trazabilidad molecular, así como para flujo génico. El componente de divulgación de los resultados fue postergado hasta un mejor contexto nacional, considerando el impacto que la entrega de éstos podría tener sobre la percepción pública.
El desarrollo de estos objetivos utilizó como técnica base la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para implementar el sistema de trazabilidad de semillas en laboratorio (Objetivo Específico 1), se recopiló toda la información del estado del arte disponible para

la detección de eventos GM específicos (artículos científicos y patentes de invención). En el caso de la implementación del Objetivo Específico 2, es decir, sistemas de detección de individuos híbridos de campo, la estrategia contempló el uso de marcadores moleculares y marcadores específicos de transgenia, como se hizo para la trazabilidad molecular.
De este modo, los impactos esperados para este esquema de trabajo, se relacionaron esencialmente con la generación de un grupo capaz de realizar la trazabilidad molecular de semillas, ubicado físicamente en SAG-Lo Aguirre; y un grupo de evaluación de flujo génico por polen, en INIA-La Platina.

2. Resultados.

2.1. Resultados obtenidos.

Los resultados esperados correspondían esencialmente al establecimiento de números que indicaran tasas de polinización cruzada para las especies en evaluación (canola, maíz y papa). Del mismo modo, s esperaba establecer protocolos que permitieran determinar semi-cuantitativamente mezclas adventicias (contaminación por GM) en sacos o embarques de semillas.
Los resultados reales obtenidos se pueden agrupar en 4 categorías:

a) Resultados de flujo génico en campos de canola y maíz GM.
b) Desarrollo de protocolos para trazabilidad molecular validados por APLAC (incluyendo información técnica de eventos específicos y línea de protocolos para detección de éstos)
c) Desarrollo de metodología y conocimiento nuevo protegido por patentamiento (en el área de la biología molecular).
d) Desarrollo de una base de datos integrativa (biodiversidad local y modelamiento de flujo génico).

Los resultados finales obtenidos difieren de aquellos originalmente planificados. A pesar de no haber sido capaces de generar del todo un grupo concreto para la trazabilidad molecular de semillas en SAG-Lo Aguirre, sí se generó un grupo operativo con capacidad técnica que podrá instalarse una vez se finalice la implementación del Laboratorio de Biotecnología de este centro. En los otros ámbitos, los resultados se cumplieron plenamente y se superó con creces la planificación inicial.
Las principales causas que explican la no consolidación de un grupo específico para trazabilidad en SAG corresponden, específicamente, a que en los inicios del proyecto no existía un lugar físico para llevar a cabo esta tarea. Hacia el período final de proyecto, éste escenario ha cambiado profundamente, y la necesidad de otorgar a este tipo de trabajos técnicos un lugar apropiado, a llevado a la construcción de un edificio específico para biotecnología.
Con respecto a la divergencia de calidad y número de resultados inicialmente planteados, las causas de esto corresponden básicamente a la escasa experiencia en el tema a inicios del proyecto. En el transcurso del proyecto se generó un grupo multidisciplinario que fue capaz de incorporar aspectos moleculares a trabajos de corte biológico, lo que permitió notoriamente expandir la tabla de resultados final. Lo mismo puede inferirse de la bases de datos generada, en donde la experiencia adquirida en la gira tecnológica FIA a GMCC´03-Dinamarca, resultó clave en el escalamiento a este tipo de trabajos informáticos.

3. Aspectos metodológicos.

3.1. Metodología.

3.1.1. Sistema de *Brassica* spp.

3.1.1.1. Selección e identificación de sitios de estudio:

La forma de cultivo cuarentenaria determinada para canola GM establece dos tipos de predios: i) campo de siembra de la misma temporada de visita (Tiempo 0) e ii) campo cuarentenario entre uno y cuatro años post-siembra del cultivo GM (Tiempo 1-4). Para la selección de campos con siembra de canola GM, se requirió información confidencial al CALT-SAG. A partir de ésta, se coordinaron visitas a las Regiones Metropolitana, VI, VII y IX, en donde se reconocieron zonas de biovigilancia para este cultivo GM (fotografías de situaciones pueden encontrarse detalladas en Informes Técnicos de Avance).

3.1.1.2. Toma de muestra y recolección de individuos potenciales híbridos:

Considerando el grado de susceptibilidad de hibridación para canola, se estableció un sistema de muestreo según el tipo de predio en año de cosecha o en año de cuarentena.

Para predios en años de cosecha (campos en tiempo cero), se delimitaron paños de 20 m de ancho por 200 m de largo, hacia fuera del cultivo, por cada contorno del campo GM.

Para predios en cuarentena (1° a 4° año de cuarentena, campos en tiempo 1 a 4), se realizó un completo análisis del sector en el cual estuvo la siembra GM, incluyendo la misma zona de cultivo.

Las muestras colectadas fueron semillas en estado fenológico suficiente como para permitir su viabilidad y plantas candidatas completas, según clasificación taxonómica *in situ*. Dicha clasificación se basó en lo descrito por Matthei (1995). Todas las semillas e individuos colectados se transportaron en bolsas de papel o plástico, respectivamente, hacia Santiago. Una vez en el laboratorio, las silícuas recolectadas se desgranaron y las semillas se clasificaron taxonómicamente (Matthei, 1995) y almacenaron en bolsas de plástico hasta su siembra. El protocolo utilizado para interrumpir la latencia de tales semillas y de 5 especies de *Brassica* (*B. juncea, B.napus, B. nigra, B. oleracea, B. rapa*) utilizadas como estándares genotípicos e inducir su germinación es aquello presente en el libro del International Seed Testing Association (ISTA), Seed Science and Tecnologies (1985).

Las semillas se dispusieron en una placa Petri o en una caja de plástico sobre un papel o entre un papel (papel plisado), dependiendo de la especie. Se agregó KNO_3 y se mantuvieron a 4ºC por 5 días. Tal tratamiento térmico, junto con KNO_3 , fueron necesarias para interrumpir la latencia.

Una vez pasado ese periodo, los recipientes contenientes del material por germinar se transfirieron a una cámara temperada a 25ºC e iluminada. Una vez que las plántulas presentan los cotiledones completamente extendidos se han traspasados a un “speedling” con arena y tierra de hoja (1:3). Posteriormente, las plantas ya completamente formadas, con tercera hoja verdadera, se transfirieron a bolsas y mantuvieron en invernadero hasta su análisis molecular.

3.1.1.3. Análisis de los individuos potenciales híbridos.

Los potenciales híbridos se sometieron a dos tipos de análisis: a) citometría de flujo y b) análisis por marcadores genéticos (nucleares y cloroplásticos) y transgén específico.

3.1.1.3.1. Citometría de flujo.

La citometría de flujo es una técnica de amplio uso en diagnóstico, especialmente en el recuento de poblaciones celulares. En nuestro caso, este análisis permite clasificar poblaciones celulares según su contenido de DNA. De este modo, las células correspondientes a *B. napus* son tetraploides, y las de *B. rapa* diploides. De producirse hibridación en campo, los híbridos generados serán triploides.

Esta estrategia, permitió analizar la totalidad de los individuos colectados por temporada, tomándose muestras de hojas jóvenes, dos por cada individuo.

Todas las hojas colectadas se transportaron en bolsas de plástico hacia el laboratorio. Una vez en el laboratorio, una hoja se almacenó –20°C y la otra se colocó en una bolsas de plástico con cierre hermético tipo "ziploc" junto con un pedacito de papel filtro humidificado con agua bidestilada. Cada bolsa se clasificó y se formaron grupos ("bulks") de 10 bolsas cada uno. Las muestras se enviaron a flor Plant Cytometry Services (Europalaan 74, 5481 JG Schijndel, Holanda). Cada vez que se enviaron muestras, se envió también controles respectivos para cada estado celular.

3.1.1.3.1.1. Calibración del sistema de citometría de flujo.

Como se mencionó, se utilizó plantas control de *B. rapa* como patrón diploide y *B. napus* como estándar tetraploide. Para generar el patrón triploide, correspondiente a los híbridos que se deberían encontrar en condiciones de campo, se realizaron las hibridaciones manuales entre los dos parentales arriba mencionados (ver abajo y resultados).

3.1.1.3.1.2. Realización de hibridación manual en invernaderos con plantas de *Brassica* sp.

Se procedió a cruzar manualmente plantas de *Brassica rapa* y de *B. napus.* La planta elegida como hembra se privó de todas las flores abiertas y se eligieron algunos botones completamente cerrados para ser polinizados (Figura 1). Tales botones se privaron de sépalos, pétalos y estambres. El pistilo, la única estructura floral restante, se polinizó con el polen recolectado de la planta macho.

La inflorescencia se marcó con la fecha y los nombres científicos de las plantas hembra y macho, indicando como primera la hembra, ejemplo *B. rapa* ♀ x *B. napus* ♂.

La planta se cubrió con una bolsa microperforada de plástico para impedir a polen foráneo la posible polinización.

a)

b)

c)

d)

e)

Figura 1. Cruzamiento manual de especies de *Brassica.* a) eliminación de las flores abiertas; b) eliminación de los pétalos y estambres; c) polinización cruzada; d) etiqueta y e) bolsa microperforada.

3.1.1.3.2. Extracción de DNA.

El protocolo que se ha utilizado para efectuar la extracción de DNA desde las plantas y semillas de *Brassica* es aquel descrito por Lodhi *et al.* (1994), brevemente:

-Se maceró material fresco (hojas) en morteros con nitrógeno líquido y se agregó solución amortiguadora de extracción CTAB (EDTA 20 mM, Tris HCl 100mM pH 8,0, NaCl 1,4 M, CTAB (bromuro de hexadeciltrimetil amonio) 2% (P/V), b- mercaptoetanol 0,2% (V/V). Se homogeneizó esta solución para a continuación agregar PVP (polivinilpolipirrolidina, 50 mg/0,5 g de tejido utilizado). Se incubó por 30 min a 65º C

-Luego, a los tubos incubados, se les adicionó mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, 0,6 ml por cada 0,5 g de tejido utilizado) y se homogeneizó hasta formar una emulsión. Se centrifugó a 6.000 rpm por 15 min.

-Se tomó la fase acuosa y se adicionaron 0,5 volúmenes de NaCl 0,5 M y 2 volúmenes de etanol 95% frío, a continuación se agitó en forma suave, para luego almacenarlo por 30 minutos a –20º C.

-Luego de la incubación, se centrifugó a 6.000 rpm por 15 minutos a 4º C. El "pellet" resultante se lavó con etanol al 70% y se dejó secar.

-El "pellet" se resuspendió en 200 ml de solución TE y se les adicionó 2 ml de RNAasa A (10 mg/ml), se incubó a 37º C por 15 minutos. Las muestras finalmente se almacenaron a 4º C hasta su uso.

En el caso de semillas de *Brassica*, un paso adicional de molienda con mortero y luego un tratamiento con nitrógeno líquido se incluyeron antes de la extracción previamente descrita.

3.1.1.3.3. Herramientas moleculares a través de marcadores en el genoma de los potenciales híbridos.

3.1.1.3.3.1. Purificación adicional de DNA:

Un paso adicional a la extracción común de DNA se instauró para todos los sistemas de extracción. Brevemente:

Se agregó a cada muestra de DNA 0,3 ml de NaI 6 M. Luego de unas inversiones para homogeneizar las soluciones se adicionó 10 µl de "glassmilk" (10 g de sílica, Sigma S-5631, en 100 ml de PBS). Los tubos se invirtieron varias veces, delicadamente, y se mantuvieron en hielo por 10-15 minutos. Luego se centrifugaron por algunos segundos y se agregó a cada tubo 0,5 ml de solución de lavado (NEW wash: NaCl 50mM, TrisHCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 2,5 mM, etanol 50% v/v) para resuspender el "pellet", se centrifugó nuevamente por pocos segundos y el sobrenadante se eliminó. Esta operación de lavado se repitió por una segunda vez. El "pellet" se resuspendió finalmente en 50 ó 100 µl de TE o H_2O destilada y secado a 55ºC por 5 minutos. Las muestras finalmente se almacenaron a –20°C hasta su uso.

3.1.1.3.3.1.1. Determinación de la calidad del DNA y cuantificación

La cantidad de DNA y su calidad es un elemento vital para el éxito de la instauración del sistema de trazabilidad molecular y análisis de híbridos. La calidad del DNA es muy importante determinarla, debido a que se requiere una calidad mínima suficiente para no inhibir la reacción de PCR y generar falsos negativos.

Como primer acercamiento, se ha realizado una electroforesis del DNA en geles de agarosa al 0,8%. La corrida se realizó en soluciones amortiguadoras TBE 1X (Sambrook *et al.*, 1989) a 100 V. El DNA se visualizó tiñendo el gel con bromuro de etidio y exposición con luz UV.

3.1.1.3.3.2. Marcadores nucleares (ISSR).

Los partidores utilizados para discriminar individuos mediante ISSR se obtuvieron desde The University of British Columbia (ver Tabla 1) y se utilizaron para amplificaciones por PCR siguiendo el protocolo descrito por Charters *et al.* (1996) con modificaciones menores. Las mezclas de reacción (20 µl) contenían una unidad de 20 ng de DNA genómico de *Brassica*, una unidad de Taq DNA polimerasa, 2,0 µl de amortiguador de reacción 10X (a una concentración final de 1X), 0,8 µl de $MgCl_2$ (50 mM) a concentración a final de 2,0 mM, 2,0 µl de mezcla de dNTPs (Boehringer Mannheim, 5 mM cada nucleótido) a concentración final de 0,25 mM, y 0,6 µl de partidor (10 mM) a una concentración final de 0,2 µM.

Las reacciones de PCR siguieron el patrón: 30 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 55°C, 30 seg a 72°C con una extensión final a 72 C.

Tabla 1. Lista de partidores ISSR utilizados.

Primer	Sequence	Primer	Sequence
801[a]	$(AT)_8T$[c]	842	$(GA)_8YG$
802	$(AT)_8G$	843	$(CT)_8RA$
803	$(AT)_8C$	844	$(CT)_8RC$
804	$(TA)_8A$	845	$(CT)_8RG$
805	$(TA)_8C$	846	$(CA)_8RT$
806	$(TA)_8G$	847	$(CA)_8RC$
807	$(AG)_8T$	848	$(CA)_8RG$
808	$(AG)_8C$	849	$(GT)_8YA$
809	$(AG)_8G$	850	$(GT)_8YC$
810	$(GA)_8T$	851	$(GT)_8YG$
811	$(GA)_8C$	852	$(TC)_8RA$
812	$(GA)_8A$	853	$(TC)_8RT$
813	$(CT)_8T$	855	$(AC)_8YT$
814	$(CT)_8A$	856	$(AC)_8YA$
815	$(CT)_8G$	857	$(AC)_8YG$
816	$(CA)_8T$	858	$(TG)_8RT$
817	$(CA)_8A$	859	$(TG)_8RC$
818	$(CA)_8G$	860	$(TG)_8RA$
819	$(GT)_8A$	861	$(ACC)_6$
820	$(GT)_8C$	863	$(AGT)_6$
821	$(GT)_8T$	864	$(ATG)_6$
822	$(TC)_8A$	865	$(CCG)_6$
823	$(TC)_8C$	866	$(CTC)_6$
824	$(TC)_8G$	868	$(GAA)_6$
825	$(AC)_8T$	869	$(GTT)_6$
826	$(AC)_8C$	870	$(TGC)_6$
827	$(AC)_8G$	872	$(GATA)_4$
828	$(TG)_8A$	873	$(GACA)_4$
829	$(TG)_8C$	874	$(CCCT)_4$
830	$(TG)_8G$	875	$(CTAG)_4$
831	$(AT)_8YA$	876	$(GATA)_2(GACA)_2$
834	$(AG)_8YT$	878	$(GGAT)_3$
835	$(AG)_8YC$	879	$(CTTCA)_3$
836	$(AG)_8YA$	880	$(GGAGA)_3$
837	$(TA)_8RT$	881	$(GGGTG)_3$
838	$(TA)_8RC$	888	$BDB(CA)_7$

839	$(TA)_8RG$	889	$DBD(AC)_7$
840	$(GA)_8YT$	890	$VHV(GT)_7$
841	$(GA)_8YC$	891	$HVH(TG)_7$
ISSR 1[d]	$BDB(TCC)_5$	ISSR 5	$(TCC)_5RY$
ISSR 2	$HVH(TCC)_5$	ISSR 6	$(CA)_8RY$
ISSR 3	$DBDA(CA)_7$	ISSR 7	$(TAA)_8$
ISSR 4	$HVH(CA)_7$	ISSR 8	$(CAC)_6$

Clave para las posiciones de bases mixtas: B= C, g, T; D= A, g, T; R= A, g; Y= C, T; H = A, C, T; V =A, C, g.

3.1.1.3.3.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante.

Los productos de ISSR se separaron en un gel de PAA al 6% y 7,5 M de urea del tipo de secuenciación. La solución de poliacrilamida-urea se preparó a partir de una solución acrilamida-bisacrilamida al 40%. El gel de poliacrilamida se preparó con una solución que contenía 70 mL de acrilamida-urea al 6%, 163 µL de persulfato de amonio 10% y 88 µL de TEMED (Sambrook *et al.*, 1989). A uno de los vidrios se aplicó RepelSilane para impedir que el gel se pegue al vidrio. Al otro vidrio se le agregó una solución compuesta por 1 mL de etanol 95%, 3 µL de BindSilano y 5 µL de ácido acético 10%. Una vez polimerizado, el gel se precorrió durante 30 min o hasta alcanzar una temperatura de 50°C, en una cámara de electroforesis vertical con TBE 0,5X como tampón de corrida. Los productos de PCR se diluyeron en un 50% con tampón de carga (95% de formamida, xilen cianol y azul de bromofenol 1 mg/mL, y EDTA 10 mM), se calentaron durante 5 min a 95°C y se colocaron en hielo inmediatamente, hasta que se cargaron en el gel. En el gel se cargó 9 µl de la mezcla.

Las muestras se sometieron a electroforesis durante 2,5-3 horas (ó hasta 5 cm antes de la salida del xilencianol del gel) a 70-80 W, a 50°C como temperatura óptima. Luego se procedió a la tinción del gel con nitrato de plata.

3.1.1.3.3.2.2. Tinción de DNA con plata.

Los productos de PCR se fijaron al gel dejándolo inmerso en 2 L de ácido acético al 10% durante 30 min o hasta la desaparición xilencianol. El ácido acético se recuperó para su uso posterior en la detención del revelado. Luego el gel se lavó 3 veces con agua destilada durante 5-10 min cada vez. Se transfirió el gel a una bandeja que contenía 2 litros de solución de nitrato de plata (1 g/L) con 3 mL de formaldehído al 37%. Al cabo de 30 min, el gel se lavó brevemente con agua destilada e inmediatamente se sumergió en la solución de revelado, carbonato de sodio (30 g/L), formaldehido al 37% y 400 µl de tiosulfato de

sodio (10 mg/ml), y se esperó la aparición de las primeras bandas. La reacción se detuvo con ácido acético y luego se lavó varias veces con agua destilada.

3.1.1.3.3.3. Marcadores genéticos y genes cloroplásticos.

Se utilizaron genes polimórficos, que en una forma ideal permitan reconocer, en forma combinada con la citometría de flujo, el origen de los parientes en los híbridos detectados. Para esto se está utilizando secuencias de genes de cloroplasto, que poseen diferencias puntuales entre las distintas *Brassica* en estudio. El requisito adicional de estas zonas génicas, es que debían incluir un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción que no fuera común a todas las especies de *Brassica*, de modo de diferenciarlas mediante una digestión de los fragmentos amplificados por PCR.

3.1.1.3.3.3.1. Utilización de genes cloroplásticos ya descritos.

La primera aproximación a esta nueva metodología fue la Identificación de la planta madre en un híbrido mediante amplificación de DNA de cloroplastos utilizando los primers Q y O, de la University of Reading (ver manuscrito preparado).

3.1.1.3.3.3.1.1. Reacciones de amplificación con primers ya descritos.

Las mezclas de reacción (40 µl) contenían una unidad de 20 ng de DNA genómico de *Brassica*, dos unidades de Taq DNA polimerasa, 4,0 µl de amortiguador de reacción 10X (a una concentración final de 1X), 1,6 µl de $MgCl_2$ (50 mM) a concentración a final de 2,0 mM, 4,0 µl de mezcla de dNTPs (Boehringer Mannheim, 5 mM cada nucleótido) a concentración final de 0,25 mM, y 1,2 µl de partidor (10 mM) a una concentración final de 0,2 µM. Las reacciones de PCR siguieron el patrón: un primer ciclo de 2 min a 94 °C seguido desde 30 ciclos de 30 sec a 94°C, 30 sec a 60°C, 1 min a 72°C con una extensión final a 72 C por 5 minutos.

3.1.1.3.3.3.2. Diseño de nuevos primers para genes genómicos polimórficos basados en el corte por enzimas restricción.

Utilizando la misma racional anterior, se diseñaron nuevos primers específicos para algunos genes genómicos utilizando la información presente en el sitio web “Brassica database” y utilizando un programa computacional, generunner. Los requisitos que se utilizaron para el diseño de estos nuevos primers fue exactamente el mismo empleado para los primers ya descritos. En la totalidad se diseñaron 12 parejas (Tabla 2) de partidores que amplificaron en las tres especies de interés de Brassica: Brassica napus, B. rapa y B. oleracea.

Tabla 2. Partidores específicos para genes organelares en *Brassica* spp.

Nombre	Primer Forward	Nombre	Primer Reverse	Gen
CoA1-F	5' CggTTCgAACgCATACCggAgCTg 3'	CoA1-R	5' gCCTgACCCTAAAgCAATCTgCCA 3'	3-Ketoacyl-CoA synthase
CoA2-F	5' CgTgAAgAgACggAgCAAg 3'	CoA2-R	5' AAgTTTCTCgCTTAACggAAg 3'	3-Ketoacyl-CoA synthase
CoA3-F	5' CCggAAAAgCCTATCggCTTACCA 3'	CoA3-R	5' CgTCTCCTTgTTgCACgCAACgAA 3'	3-Ketoacyl-CoA synthase
ChiA1-F	5'AgggAAATCATCggCACgTCCCTT 3'	ChiA1-R	5' TTAACAgATATAgACAAgTTTAgA 3'	Acidic endochitinase
ChiA2-F	5' TCggCACgTCCCTTAggTgATgCT 3'	ChiA2-R	5' CgggACCTATACAAgACTTAAATg 3'	Acidic endochitinase
ChiA3-F	5' CTCCTCAACACTgggATgATCTTG 3'	ChiA3-R	5' CgTCTggAAATggACACTgAggAg 3'	Acidic endochitinase
CADa1-F	5' CCgTAggAgATgTggTCggAgTCg 3'	CADa1-R	5'ACATTAgACCgAAgTggCTCAACg 3'	Cinnamyl alcohol dehydrogenase
CADa2-F	5' AAACCAACTCAAggTggCTTCgCT 3'	CADa2-R	5' CCAAGAATGACGAGAGGGGTGATG 3'	Cinnamyl alcohol dehydrogenase
4CL-A1-F	5' TATgAAACgAACATggTTTTggTT 3'	4CL-A1-R	5'TGATTCTCTTGTAAAACACAACCT 3'	4-coumarate-CoA ligase
4CL-A2-F	5' TACAAAggTTTTCAAgTggCTCCg 3'	4CL-A2-R	5' AggACATTgTCgTTAACCCTAggC 3'	4-coumarate-CoA ligase
Chi1-F	5' gAAACTgATATgACgTgATCTCAA 3'	Chi1-R	5' gAgACTCTggCCACAAgCTCCgTA 3'	Chitinase
Chi2-F	5' gATCTCAATTAgTTggAATgATCC 3'	Chi2-R	5' TTgggTTgCTACTCACTAgCTCgg 3'	Chitinase

3.1.1.3.3.3.2.1. Amplificación por PCR utilizando los nuevos primers.

En líneas generales se utilizaron las condiciones para PCR descritas por Charters *et al.* (1996) con modificaciones menores. Las mezclas de reacción (40 µl) contenían una unidad de 20 ng de DNA genómico de Brassica, dos unidades de Taq DNA polimerasa, 4,0 µl de amortiguador de reacción 10X (a una concentración final de 1X), 1,6 µl de $MgCl_2$ (50 mM) a concentración a final de 2,0 mM, 4,0 µl de mezcla de dNTPs (Boehringer Mannheim, 5 mM cada nucleótido) a concentración final de 0,25 mM, y 1,2 µl de partidor (10 mM) a una concentración final de 0,2 µM.
Las reacciones de PCR siguieron el perfil térmico: un primer ciclo de 7 min a 94 °C seguido desde 35 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 60°C, 1 min a 72°C con una extensión final a 72 C por 7 minutos.

3.1.1.3.3.3.2.2. Digestión de los productos de amplificación mediante enzimas de restricción.

Se utilizaron distintas enzimas de restricción para digerir los productos amplificados con los nuevos partidores diseñados. La mezcla de reacción (20 µl) contenía 0,1 µl de enzima (1 U), 2 µl de Buffer específico por cada enzima, 12,9 µl de agua bidestilada y 5 µl de amplificado. La digestión se efectuó a 37° C por 2 horas.

3.1.1.3.3.4. Análisis de flujo del transgén en potenciales híbridos.

Se decidió implementar un nuevo marcador de flujo del transgén, basado en la información confidencial del CALT acerca del transgén utilizado en cada evento GM cultivado, vale decir, detección del transgén específico. En todos los casos analizados de *Brassica* GM, el carácter introducido corresponde a resistencia a fosfinotricina (glifosato), es decir, el gen bar.
Para esto, los procedimientos utilizados tanto de extracción de DNA como de purificación adicional, se aplicaron también a la evaluación de la transmisión del gen para resistencia a herbicida.
En líneas generales, los partidores utilizados para *Brassica* spp. fueron:

Partidor	Evento	Secuencia (5`-3`)	Acceso Genebank
CAN 2F	GT73	CCGTAAGGAAGGTGATACTTGGA	A59871
CAN 2R	GT73	CATGATTGGCTCGATAACAGTGGT	A59871
4 EPSPS F	GT73	CAACGCAAATCTCCCTTATCGG	A59871
4 EPSPS R	GT73	GACCTCCAAACATGAAGGACCT	A59871
BarFor	todos	TACCGGCAGGCTGAAGTCC	
BarRe	todos	AACTTCCGTACCGAGCCG CA	

3.1.1.3.3.5. Uso del gen srk de autoincompatibilidad sexual como marcador de híbridos del género *Brassica* spp.

Como desarrollo tecnológico nuevo, se utilizó el gen del receptor quinasa como un marcador de híbridos inter-específicos. La descripción, base teórica de la aproximación experimental, metodología y resultados se presentan como anexo en la aplicación de patente chilena CL 3454-2005.

3.1.2. Sistema de *Zea mays*.

3.1.2.1. Prospecciones.

En líneas generales, las prospecciones durante las temporadas de trabajo mostraron campos GM con la configuración de la Figura 2.

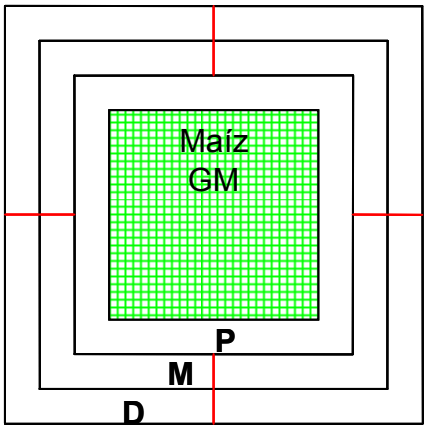


Figura 2. Esquema general de campos de maíz GM en Chile. Se muestra la disposición del campo transgénico (en verde), y las hileras de seguridad de maíz no transgénico (en negro). Las cuales, para su muestreo, se subdividieron como se muestra en las líneas rojas y a su vez enumerando las líneas en forma longitudinal y las hileras en proximal (P), media (M) y distal (D).

3.1.2.2. Recuperación de individuos.

Los individuos se recolectaron en función de su ubicación cardinal y distancia al núcleo GM. Luego, estos se trajeron al laboratorio en donde para recuperación mediante siembra en bandejas "speedling". Tras esto, se procedió al análisis molecular, mediante purificación de DNA genómico, amplificación de elementos reguladores del transgén (promotor y terminador) y gen específico, de ser posible.

3.1.2.3. Implementación del sistema molecular para análisis.

Para el buen desarrollo del sistema de detección del flujo hacia las barreras de contención fijadas por CAL, se procedió al diseño de una estrategia general que permitiera desarrollar análisis por PCR de los transgenes utilizados. Éstos señalan en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3. Primers utilizados para la detección de flujo génico en maíz.

Primer	Fragmento	Secuencia
BAR I	417	5' gcc agt tcc cgt gct tga 3' for 5' cgg tct gca cca tcg tca 3' rev
BAR II	441	5' cca gct gcc aga aac cc 3' for 5' cgg tct gca cca tcg tca 3' rev
EPSPS I	588	5' tcg cgt gcc gat ggc ctc 3' for 5' cgt gcg acc gct gcc aga 3' rev
EPSPS II	695	5' cgc gtg ctg aac ccg ttg 3' for 5' cgt gcg acc gct gcc aga 3' rev
EPSPS III	401	5' ggc cag ggc aag ctt gtc 3' for 5' cgt gcg acc gct gcc aga 3' rev
GOX I	429	5' aat ccg caa ggg ctc gtg 3' for 5' cgc gag ggc tgg aag aag 3' rev
GOX II	456	5' gcg tgc cga agt ggc tcc 3' for 5' cgc cac cgt tcg cga taa 3' rev
GOX III	444	5' ggc tcc ttg acc cga tgg 3' for 5' cgc cac cgt tcg cga taa 3' rev
CRYA I	530	5' tgg aca aca acc caa aca tca acg 3' for 5' cac gct gac gtc tcg cag cac gct3' rev
CRYA II	869	5' aga gtt cgc cag caa cca ggc cat 3' for 5' gct ggt tgt tga tgc cga tgt tga 3' rev
CRYA III	567	5' aga gtt cgc cag caa cca ggc cat 3' for 5' ccg tgc aag ttc tcc agc act ggg 3' rev

Se desarrollaron mezclas de reacción de 25 µl totales que contenían 5 µl de DNA genómico de maíz GM dilución 1/50, 1 µl de Taq DNA polimerasa, 2,5 µl de amortiguador de reacción 10X (a una concentración final de 1X), 0,5 µl de $MgCl_2$ (50 mM) a concentración final de 1.0 mM, 1,0 µl de mezcla dNTPs (Boehringer Mannheim, 25 mM cada nucleótido) a concentración final de 4 mM, y 0,5 µl de partidor (10 µM), a una concentración final de 0,2 µM. Las reacciones se evaluaron por separación en geles de agarosa de 1,5 % y tinción con bromuro de etidio.

3.1.2.4. Viabilidad de polen.

Para analizar la viabilidad del polen de los individuos híbridos, se obtuvieron plantas de maíz GM bajo condiciones de invernadero como se muestra en la Figura 3.

Figura 3. Plantas obtenidas en invernadero de bioseguridad con el propósito degenerar inflorescencias masculinas.

Luego de dos meses de desarrollo bajo un foto periodo de 16 horas de luz (día largo), las plantas comenzaron su ciclo de floración (Figura 4) y producción normal de polen (Figura 5).

Figura 4. Planta de maíz en estado adulto en plena floración con inflorescencia masculina en la parte apical y la inflorescencia femenina en la parte media de la planta.

Figura 5. Inflorescencia masculina en plena producción de polen.

En la etapa de plena liberación de polen, período que dura aproximadamente una semana, se realizaron recolecciones a horarios fisiológicamente apropiados correspondientes a anteras abiertas (10,30 AM) (Figura 6).

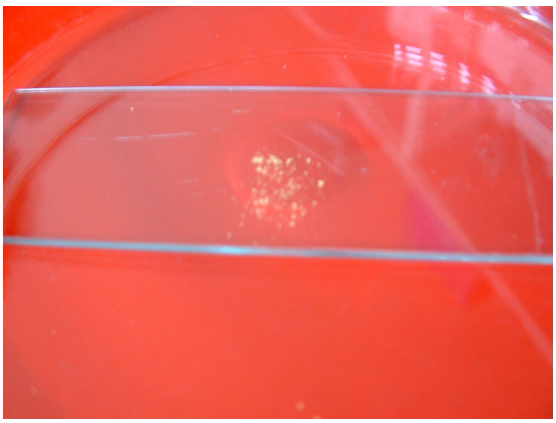


Figura 6. Colecta de polen en porta objetos dotados con una cavidad receptora.

El polen así colectado se sometió a dos condiciones dos condiciones diferentes:
25°C y 54% de HR (Condiciones de laboratorio).
21°C y 65% de HR. (Condiciones de invernadero).
La viabilidad de estas estructuras fue determinada por tinción simple con una solución de MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)2,5-difenil bomuro de tetrazolium), durante media hora como mínimo para posteriormente ser evaluadas al microscopio óptico. La diferencia entre granos viables y

no viables se muestra en la Figura 7, en donde se aprecia una fuerte coloración debido a la impregnación de MTT en gránulo de polen viable. Por el contrario, granos de polen sin viabilidad se no se tiñen o lo hacen escasamente con este colorante.

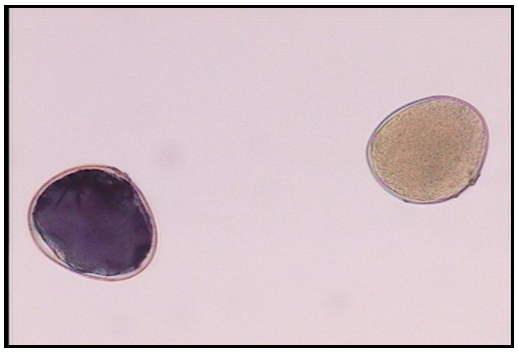


Figura 7. Muestra de dos granos de polen teñidos con MTT. El de la izquierda (color púrpura) es un grano viable y a la derecha se aprecia un grano sin teñir lo que indica que es un grano de polen inviable.

3.1.3. Sistema *Solanaceae* spp.

3.1.3.1. Material y estrategia (trabajo en marcha).

Para este sistema, se ha trabajado bajo la hipótesis de que existirían distintos grados de hibridación entre la papa cultivada *Solanum tuberosum* y especies silvestres del mismo género. De esta forma, los trabajos aún en realización, están destinados a determinar la posibilidad y grado de polinización cruzada entre *Solanum tuberosum* y quince especies silvestres del género *Solanum* presentes en Chile.

Se utiliza material vegetal de *Solanum tuberosum* proporcionado por el CRI La Pampa de INIA. Los cultivares Yagana, Desirée, Cardinal, Karu se utilizan como receptores y dadores de polen. Estos fueron seleccionados debido a su importancia en el país y por su capacidad dadora de polen.

Adicionalmente se utilizan Solanáceas silvestres obtenidas del Banco Base de Semillas del INIA, del Center of Genetic Resource, The Netherlands (CGN) y del Potato Germplasm Introduction Station (NR6), EEUU.

Las especies seleccionadas fueron las siguientes:

<u>Endémicas</u>*: S. etuberosum* (PI245924, PI558284, PI558297), *S. fernandezianum* (PI566753), *S. heterantherum* (INIABB27), *S. lycopersicoides* (LPXX), *S. palustre* (PI558037, PI558282, PI558283) y *S. remyanum* (INIABB67, INIABB74).

<u>Nativas</u>*:* S. ligustrinum (INIABB181), S. maglia (PI558316, CGN18064) y S. tuberosum ssp tuberosum (PI245317, PI245815, PI245935)

<u>Introducidas</u>: *S. albicans* (PI365306), *S. chacoense* (PI320285), *S. stoloniferum* (PI558394, PI558471) y *S. verrucosum* (PI275250).

Especies no identificadas: *Solanum sp1* (KEW29) y *Solanum sp2* (INIALP2)

3.1.3.2. Tratamientos.

Se realizan cruzamientos entre 15 especies silvestres utilizadas como hembras y un pool de polen de los cvs de papas cultivadas y en forma recíproca se realizan los cruzamientos entre los 4 cvs (hembras) y las 15 especies silvestres. Se ocupan 5 plantas hembras por cada especie y cultivar y un mínimo de 5 flores por planta, obteniendo un total de 75 cruzamientos y 1875 polinizaciones.

Se utiliza una parcela de 81.2 m^2, en donde se establecieron las plantas hembras separadas a 70 cm entre hileras y 25 cm sobre la hilera. Con el propósito de tener floración prolongada se establecieron dos fechas de transplante. Las plantas machos se encuentran ubicadas en macetas en un sombreadero.

Para realizar los cruzamientos se emasculan flores inmaduras y se utiliza polen colectado y almacenado en frío o del día de la polinización. Dichos cruzamientos son etiquetados y cubiertos con unas bolsas. Se lleva un registro del número de polinizaciones por cruzamiento. Luego, cuando se produce la abscisión de frutos, estos son removidos y almacenados a temperatura ambiente hasta que se extraigan las semillas.

3.1.3.3. Variables a evaluar.

Para cada cruzamiento se registra:

- Cuaja (%): Número de frutos cuajados / número de polinizaciones
- Número de semillas/fruto (s/f)

Otras evaluaciones de apoyo utilizadas corresponden a:

a) Viabilidad del polen (%): Cada 7 días se hacen recuentos de viabilidad con una solución de 4:6 de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (10g/ml) y sacarosa (diluida al 60%) que tiñe los granos viables. Para lo cual se pone una gota de la solución MTT: sacarosa en un portaobjeto cóncavo, luego se pone el polen y se cubre con un cubreobjeto. Luego de media hora, se observa en un microscopio con un ocular 10 X y objetivo 10 y 20 X. Se observan un campo con tres repeticiones para establecer el porcentaje de granos viables (aquellos teñidos).

b) Compatibilidad polen-pistilo: Se polinizan específicamente 5 flores de especies silvestres con polen de papa cultivada para evaluar la compatibilidad de los cruzamientos a través de la observación del crecimiento de los tubos polínicos en los pistilos. Luego de 72 h de la polinización se remueven las flores. Los pistilos se fijan en una solución 3:1, ácido glacial acético: etanol 95% para luego almacenarlos a 7ºC hasta que se examine el crecimiento del tubo polínico. Los pistilos son teñidos de acuerdo a Martín (1958), para ello los pistilos polinizados se retiran de la solución de fijación y son enjuagados en agua destilada y tratados por 8 a 24 h con 8N NaOH para ablandar el tejido, luego se vuelven a enjuagar en agua destilada por 1 h. Los pistilos se colocan en un portaobjeto y se tiñen con azul de anilina (0,05% anilina azul, 0.1N K_2PO_4) para proceder a observar en un microscopio de fluorescencia UV el crecimiento del tubo polínico. Esto es medido arbitrariamente a 6 regiones del estilo desde el estigma (0) a la base del estilo (6).

c) Medición de polen 2n: Es determinado poniendo una pequeña cantidad de polen en un portaobjeto en presencia de acetocarmín–glicerol. El tamaño de polen se analiza con un microscopio 40X y los granos de polen que tengan un largo menor a 1.2X se consideran como polen 2n. Se cunetan por lo menos 4 campos con 100 granos de polen y se obtiene el promedio de polen 2n. Si existe menos del 5% de polen 2n se considera deberse a la variación natural en el tamaño del polen.

3.1.4. Trazabilidad de semillas.

3.1.4.1. Sistema de trazabilidad para maíz GM como modelo.

3.1.4.1.1. Muestreo de semillas de maíz GM.

Las muestras correspondieron a material cedido por el Laboratorio de Semillas de SAG- Lo Aguirre, Centro Certificado por ISTA (International Seed Trade Association (Bould, 1986). Se tomaron muestras de semillas certificadas transgénicas y semillas certificadas no transgénicas. Se hicieron 16 lotes de 25 semillas para cada caso. Se realizó además una mezcla entre ambas semillas para contar con 1% de trasgenia y se procedió a dividir esta muestra también en 16 lotes de 25 semillas. Para realizar el conteo de las semillas en forma automatizada y semejando las condiciones que se utilizarán al trabajar con grandes volúmenes de semillas, se utilizó un contador de semillas (Seedburo™ 801 count-A-Pak®) para conformar los lotes.

3.1.4.1.2. Extracción de DNA desde material vegetal.

Los lotes se molieron en molinillos (Cemotec 1090 sample mill, Tecator, EE.UU.) con la opción de molienda más fina (harina). Se comenzó la molienda con los lotes de maíz certificadamente no transgénico, limpiando interiormente el molinillo entre lote. Se siguió con los 16 lotes de 1% de transgenia y finalmente se molieron los lotes certificadamente transgénicos tomando la misma precaución de limpiar entre lote. Adicionalmente, se efectuó la molienda de semillas de trigo entre lotes como medida de precaución y limpieza del molinillo.
Las muestras de harina fueron colocadas en bolsas plásticas y se les agregó 15 ml de tampón de extracción (Zhang *et al.*. 1998) con 3% de CTAB. Se homogenizó la harina con el tampón y se extrajo 800 µl de extracto por muestra, lo que se llevó a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Los

tubos se colocaron incubaron a 65°C por 20 minutos, posteriormente se les agregó 800 µl de cloroformo y se centrifugaron a 14.000 r.p.m. por 10 minutos a 20°C.
Se traspasó la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf y se agregó isopropanol para incubar a –20°C por 2 horas. Las muestras se centrifugaron a 14.000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El "pellet" se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 14.000 r.p.m. por 5 minutos a 4°C . Se descartó el sobrenadante y el "pellet" se dejó secar al aire. Una vez que el "pellet" estuvo seco, se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril, se le agregó 1 µl de RNAasa 10mg/ml y se incubó por 15 minutos a 37°C. El DNA se almacenó, posteriormente, a 4ºC hasta su amplificación por PCR.

3.1.4.1.3. Cuantificación de DNA.

Las muestras purificadas de todo el material gen{omico utilizado en este trabajo ha sido cuntificado por fluorimetría. Para ello se utilizó el equipo DyNA Quant 200 (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) y los protocolos proporcionados por el distribuidor.

3.1.4.2. Análisis de porcentajes de mezclas de semillas de maíz GM.

3.1.4.2.1. Marcadores moleculares utilizados.

Para la detección de semillas GM, se utilizaron como marcadores los siguientes elementos: a) el promotor 35S (derivado del RNA 35S del virus del mosaico de la coliflor), y b) el terminador *nos* (presente en el gen de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens*)

3.1.4.2.2. Amplificación por PCR.

El DNA obtenido se visualizó en un gel de agarosa al 0,8% y se decidió diluir los DNA extraídos en la proporción 1:10. Posteriormente, se realizó la amplificación por PCR de los DNA extraídos y diluidos para lo cual se utilizó el siguiente MIX por tubo: 16 µl de agua, 2,5 µl de Buffer 10X, 2,0 µl de dNTPs 2mM, 2,0 µl de $MgCl_2$ 50mM, 1,0 ul de Taq DNA polimerasa, 2 µl de DNA diluido 1:10 y 0,5 µl de cada uno de los partidores utilizados para cada objetivo que se detalla a continuación:

a) Para verificar si el DNA de maíz era capaz de inhibir la reacción de PCR, se amplificó una secuencia conservada del maíz, un microsatélites (SSR) cuyos partidores fueron los siguientes:

Maíz forw: 5'-CTTTCGTCATACACACACATTCA 3'
Maíz rev: 5'- ATGGAGCATGAGCTTGAATATTT 3'

El perfil térmico utilizado en este caso fue 95ºC por 5 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 94ºC, 30 segundos a 57ºC y 45 segundos a 72ºC y 72ºC por 5 minutos.

b) Para la reacción específica de PCR se utilizaron los partidores para la detección del promotor 35S (derivado del RNA 35S del virus del mosaico de la coliflor) que generaron un amplificado de 195 pares de bases. Los partidores utilizados fueron los siguientes:

35S forw: 5' GCTCCTACAAATGCCATCA 3'
35S rev: 5' GATAGTGGGATTGTGCGTCA 3'

El perfil térmico utilizado fue de 94ºC por 1 minuto, 10 ciclos de 1 minuto a 94ºC, 1 minuto de alineamiento con un gradiente de temperaturas que comienza a 67ºC y finaliza a los 62ºC (0,5ºC/ciclo). Luego 25 ciclos manteniendo el alineamiento a 62ºC. En el último paso se realiza una extensión por 5 minutos a 72ºC.
Estos partidores generan un producto de PCR de 195 pbs.

c) Para la reacción específica también se utilizaron los partidores para el terminador NOS. En este caso los partidores utilizados fueron los siguientes:

NOS forw: 5' GAATCCTGTTGCCGGTCTTG 3'
NOS rev: 5' TTATCCTAGTTTGCGCGCTA 3'

El perfil térmico utilizado en este caso fue 94ºC por 5 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 94ºC, 30 segundos a 55ºC y 45 segundos a 72ºC y 72ºC por 5 minutos.
Estos partidores generan un producto de PCR de 181 pbs.

El diseño de estos partidores se realizó mediante VectorNTi-software, versión 7.0 (Informas, Inc., North Bethesda, MD, EE.UU.)

3.1.4.2.3. Evaluación de fragmentos amplificados.
Los productos de amplificación de las reacciones de PCR se evaluaron por medio de la separación electroforética en geles de agarosa 2% y tinción con bromuro de etidio según Sambrook *et al.* (1989).

3.1.4.2.4. Análisis estadístico.
El sistema cuantitativo establecido para maíz está basado en que la probabilidad de que un grupo de muestras tenga resultado negativo (ausencia de producto de PCR) es una función del número de granos del grupo de muestras y de la frecuencia del evento negativo, en nuestro caso, de la frecuencia de granos no GM (Tozzini *et al.*, 2000). Según esto, se diseñó la generación de 25 lotes de 16 semillas a partir de muestras generadas a base de porcentaje peso/peso, vale decir, muestras problema constituidas por X g de maíz GM dentro de un grupo de Y g de maíz no GM para dar una muestra de X+Y g totales.

Sólo una semilla GM en el lote será suficiente para generar un resultado positivo en PCR, por lo que un resultado negativo será obtenido solo cuando todos los granos del lote son no GM, por lo tanto se tiene:

$$P(-)= (\text{Frec. Libre de GM})^n \quad y \quad P(+)= 1 - P(-)$$

Donde
P(-) es la probabilidad de un resultado negativo, PCR negativo en el lote
P(+) es la probabilidad de un resultado positivo, PCR positivo en el lote
Frec. Libre de GM es la frecuencia relativa (probabilidad) de granos no GM
N es el número de granos del lote

Así, la P(-) aplicada un un número de lotes dará el número esperado de lotes negativos del total de lotes analizado,

$$X=P(-)\ N$$

Donde
X es el número esperado de lotes no GM
N es el número total de lotes analizado.

Los resultados esperados para 16 lotes de 25 semillas se indican en la tabla siguiente:

Número de lotes PCR positivo	Porcentaje Peso/Peso de material GM en muestra
1	0,26
2	0,53
3	0,83
4	1,14
5	1,49
6	1,86
7	2,28
8	2,73
9	3,25
10	3,85
11	4,55
12	5,39
13	6,48
14	7,98
15	10,50
16	No determinado

Se trabajó con un intervalo de confianza del 5%, con un límite de detección de 0,25% de maíz GM.

3.1.5. Programa APLAC T034.

El programa de eficiencia de prueba de organismos genéticamente modificados (T034 GMO) de la Agencia de Cooperación de Acreditación de Laboratorios de Asia-Pacífico (APLAC), corresponde a un programa de pruebas Inter-laboratorios, que tuvo como objetivo cubrir el uso de pruebas cualitativas y cuantitativas para soya genéticamente modificada, con el propósito de establecer comparación de resultados Inter.-laboratorio de la eficiencia de las pruebas realizadas, y evaluar el desempeño individual de cada uno de los laboratorios para los test específicos.

Para éste propósito se congregaron a participantes pertenecientes a APLAC, a la Agencia de Cooperación para la Acreditación Europea (EA), de la Agencia de Cooperación para la Acreditación Interamericana (IAAC) y miembros de otros cuerpos de acreditación de laboratorios para nominar laboratorios para éste programa de acreditación. Un total de 55 laboratorios fueron nominados, incluyendo un laboratorio no nominado por ningún cuerpo de acreditación, 49 de los cuales participaron en el programa de evaluación de pruebas cualitativas, y 45 laboratorios fueron seleccionados para efectuar las pruebas cuantitativas. A cada uno de los laboratorios se les asignó un código, y todas las referencias a éstos están asociadas a dichos códigos.

3.1.5.1. Programa de pruebas cualitativas.

El programa de pruebas cualitativas evaluó la habilidad de los laboratorios participantes para testear una línea específica de soya transgénica resistente al herbicida Roundup Ready ® (línea GTS 40 3-2) perteneciente a la compañía Monsanto s.a. con el objetivo de calificar la habilidad de los laboratorios participantes de manejar muestras de alimentos que impliquen el uso de Soya resistente a herbicida Roundup Ready ®. Los métodos comunes a evaluar fueron Gel-PCR, PCR en tiempo real (real time PCR) (7), PCR anidado (nested PCR), PCR de umbral (threshold PCR), PCR multiplex, Inmunoensayo con anticuerpos y ELISA, el límite de detección de los métodos empleados varían entre el 0,01% al 0,5%.

3.1.5.2. Programa de pruebas cuantitativas.

El diseño de la cantidad de soya transgénica por muestra fue establecido diferencialmente, y fue diseñado con respecto a la información de precisión obtenida desde un método relevante de comparación para la confirmación Inter.-laboratorios (Shindo *y cols*).

3.1.5.3. Muestras y rotulación.

El laboratorio de Biotecnología, del Centro Regional de Investigación (CRI) del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA-LaPlatina), fue designado por el Instituto Nacional de Normalización (INN) para participar en el programa APLAC T034 GMO para la acreditación de evaluación de organismos genéticamente modificados que incluyan el uso de

Soya resistente a herbicida Roundup Ready ®, se asignó el código T034-038 para el laboratorio, y todas las referencias a él se refirieron a dicho código. En la fecha 12 de septiembre de 2003 se recibió mediante correo directo (TNT Express) un número de 2 muestras envasadas en tubos de vidrio, correspondientes a una muestra para análisis cualitativo (A077) y una para análisis cualitativo (A211), en conjunto con la formas correspondientes para el recibo de muestras y el registro de los resultados obtenidos.

3.1.5.4. Envío de resultados y evaluación.

Los resultados obtenidos fueron enviados a la institución organizadora mediante fax las formas recibidas, describiendo brevemente los métodos utilizados.

3.1.5.5. Materiales y Métodos

3.1.5.5.1. Materiales

- Semillas de soya catalogadas GM resistentes a Roundup Ready ®y no GM.
- Solución amortiguadora de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10mM, NaCl 100 mM, SDS 1% p/v) más 0,5 µL de 2-mercaptoetanol.
- Solución amortiguadora de PCR 10X (KCl 5 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,3).
- Solución TBE 10X (Tris-HCl 0,88 M pH 8,3; ácido bórico 0,88 M; EDTA 10 mM pH 8,0).
- Solución amortiguadora de carga para geles de agarosa 6X (Azul de bromofenol 0,25 %; xilencianol 0,25 %; glicerol 30% en H_2O destilada).
- Acetato de potasio 5M pH 7,4 (Winkler Ltda. Santiago, Chile).
- Agarosa (Winkler Ltda. Santiago, Chile).
- Bromuro de etidio 0,25 mg/mL (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, E.E.U.U.) .
- DNA polimerasa Taq (Stock de laboratorio, INIA La Platina).
- dNTPS: dATP; dTTP; dGTP; dCTP 100mM (Boeheringer Manheim, Alemania).
- Etanol (Merck, Alemania).
- Isopropanol (Merck, Alemania).
- $MgCl_2$ 50 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, E.E.U.U.).
- Nitrógeno líquido (Indura, Santiago, Chile).
- RNAsa A (Stock de laboratorio, INIA La Platina).

3.1.5.5.2. Métodos

3.1.5.5.2.1. Preparación y condiciones de muestras.

Las muestras fueron preparadas, distribuidas y almacenadas, de acuerdo a las carácterísticas propias del lugar de destino, indicadas por la entidad organizadora. Cada muestra llegó congelada y secada, cuyo peso aproximado era de 1 g cada una, las cuales se enviaron mediante correo a temperatura ambiente, las cuales debieron ser almacenadas entre 2 y 6°C inmediatamente después de la llegada, y los tests debieron ser desarrollados inmediatamente en el momento de abrir los tubos, debido a que factores como la contaminación y el cambio de temperatura pueden afectar las propiedades de las muestras (8).

3.1.5.5.2.2. Diseño de partidores específicos para eventos de soya transgénica.

Ya conocido de antemano el evento a analizar, se buscaron en bases de datos públicas como www.ncbi.nlm.nih.gov las secuencias propias de la línea GTS 40 3-2 resistente a Roundup Ready ®, las que fueron analizadas a mediante el programa computacional Primer-Master 1.0 (Vitali Proutski, Sn. Petersburgo, Rusia).

3.1.5.5.2.3. Extracción de DNA genómico.

Con el objetivo de tener muestras blanco objetivas, se procedió a extraer DNA genómico de semillas de soya catalogadas como no genéticamente modificadas (no GM) y maíz no GM con el Servicio Agrícola Ganadero, utilizando el método descrito por Dellaporta *y cols.*para extracción de DNA genómico de granos de soya y maíz con ligeras modificaciones (1, 2), el cual consistió en:

- Se molieron muestras de semilla 70 mg en una máquina de moler granos de café, utilizando tres lavados entre muestra y muestra con soya no GM.
- Se depositaron posteriormente en tubos eppendorf de 1,7 mL.
- Se agregó 700 mL de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10mM, NaCl 100 mM, SDS 1% p/v) más 0,5 µL de 2-mercaptoetanol.
- Se incubó durante 10 minutos en baño de agua a 65°C.
- Se dejó enfriar durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregaron 200 µL de Acetato de Potasio 5 M pH 7.4y se agitó enérgicamente la emulsión obtenida durante 3 minutos.
- Se mantuvo la emulsión durante 10 minutos en hielo.
- Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Se transfirieron 400 µL del sobrenadante a un tubo nuevo.
- Se agregó 1 volumen de isopropanol frío y se homgenizó durante 3 minutos.
- Se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C, y se descartó el sobrenadante.
- Se lavó con 1mL de Etanol 70% el precipitado.
- Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- El sedimento obtenido se secó en cama caliente, y se dejó enfriar durante 3 minutos a T° ambiente.
- Se resuspende el sedimento en 100 µL de agua estéril.
- Finalmente se agregó 4 µL de RNAsa y se incubó durante 40 minutos en baño de agua a 37°C.

3.1.5.5.2.4. Determinación de la calidad del DNA.

La reacción de amplificación por la DNA polimerasa *Taq* puede verse afectada por la presencia de proteínas inhibidoras de su actividad. Debido a ésto es necesario tener DNA en cantidad y con calidad adecuada para este propósito. Con el fin de conocer la calidad del DNA se realizó electroforesis del DNA en geles de agarosa al 0,8% (p/v). La electroforesis se realizó en soluciones amortiguadoras TAE 1X (Sambrook *y cols*., 1989) a 100 V. El DNA se visualizó tiñendo el gel con bromuro de etidio y exposición a luz UV.

3.1.5.5.2.5. Amplificación mediante PCR.

El análisis cualitativo se realizó mediante amplificación de regiones específicas del evento de transformación de soya GTS 40 3-2, para lo cual se utilizó un programa común para todas las regiones consistente en:

1) Etapa de pre-denaturación a 94°C durante 4 minuto.
2) Etapa de denaturación a 94°C durante 1 minuto.
3) Etapa de apareamiento (annealing) a 57°C durante 1 minuto.
4) Etapa de amplificación a 72° C durante 45 segundos.
5) 32 repeticiones del ciclo correspondiente a las etapas 2 a la 4.
6) Etapa de amplificación final a 72°C durante 4 minutos.

La mezcla de reacción (30 µL de volumen total) consistió en DNA genómico de soya utilizado en concentración inicial y diluciónes 1:10, 1:100 y 1:1000, una unidad de DNA polimerasa Taq (1 µL), 3,0 µL de amortiguador de reacción 10X (a una concentración final de 1X), 2 µL de $MgCl_2$ (50 mM) a concentración a final de 3 mM, 3 µL de mezcla de dNTPs (solución madre 5 mM de cada nucleótido) a concentración final de 2,5 mM, y 1 µL de cada partidor (10 mM) a una concentración final de 0,03 µM..

Se utilizaron como controles negativos soya convencional no GM, maìz convencional no GM y agua.

3.1.5.5.2.6. Análisis cuantitativo mediante espectrofotometría.

Para establecer la cantidad de DNA proveniente de cada muestra se procedió a medir mediante espectrofotometría la relación entre las absorbancias de las muestras a 260 y 280 nm tanto en la muestra cualitativa como en la cuantitativa.

3.1.5.6. Resultados

3.1.5.6.1. Partidores diseñados.

Se diseñaron pares de partidores destinados para la amplificación de segmentos que involucraran tanto el transgén de resistencia a herbicida como para los extremos planta inserto. A la vez se utilizaron los diseñados en Tozzini *y cols* (2000) (Tabla 4).

Tabla 4. Muestra los partidores diseñados para la determinación cualitativa de soya transgénica. La temperatura de alineamiento seleccionada común para todos los partidores fue de 57°C.

Partidor	Secuencia	Tamaño amplicón	Nota
GTS5 forward	5´CGTGGGTGGGGTCCATCTTTGGGA 3´	291	Extremo 5´ planta inserto
GTS5 reverse	5´GATTTGAATTCAGAACCTTGTGCA 3´		
GTS3 forward	5´TTTCTGTTGAATACGTTAAGCATG 3´	860	Extremo 3´ planta-inserto
GTS3 reverse	5´TTGAAGCTTAATCTTATCTTT 3´		
4032-31 forward	5´CATGTAATGCATGACGTT 3´	750	Extremo 3´ planta inserto
4032-31 reverse	5´CATTCTGGGAGAAGCAGT 3´		
4032-5 forward	5´TTGGGACCCTGTCGGCAG 3´	240	Extremo 5´ planta inserto
4032-5 reverse	5´ACCCTTCAATTTAACCGA 3´		
4032-3 forward	5´GCTGGGAAATTTTAGCGA 3´	340	Extremo 3´ planta inserto
4032-3 reverse	5´TCCGATCATTCTGGGAGA 3´		
GTS3-1 forward	5´TTTCTGTTGAATACGTTAAGCATG 3´	450	GTS3 con rev distinto
GTS3-1 reverse	5´CCAGCATGATGCGCTTGAAATCG 3´		

3.1.5.6.2. Extracción de DNA genómico desde semillas de soya.

La calidad del DNA obtenida desde semillas de soya se observa en la Figura 8.

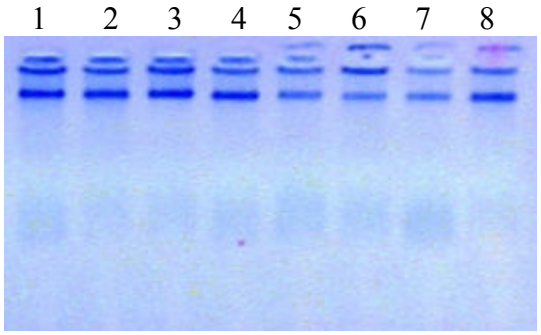


Figura 8. Gel de agarosa 0,8 % teñido con bromuro de etidio con muestras extraídas desde semillas de maíz convencional no GM (líneas 1 a la 4) y semillas de soya convencional no GM (líneas 5 a la 8).

3.1.5.6.3. Análisis cualitativo mediante amplificación por PCR.

De todos los pares de partidores diseñados para detectar la existencia de soya transgénica en las muestras analizadas sólo dos pares resultaron ser eficientes para detectar la prescencia de la línea de soya transgénica GTS 40 3-2, los cuales correspondieron a 4032-5 y 4032-3, que corresponden a las zonas de inserción izquierda y derecha en la planta de dicho evento.

Ambas muestras, tanto la muestra cuantitativa (A211), como la cualitativa (A077) indicaron la presencia de soya transgénica (Figura 9).

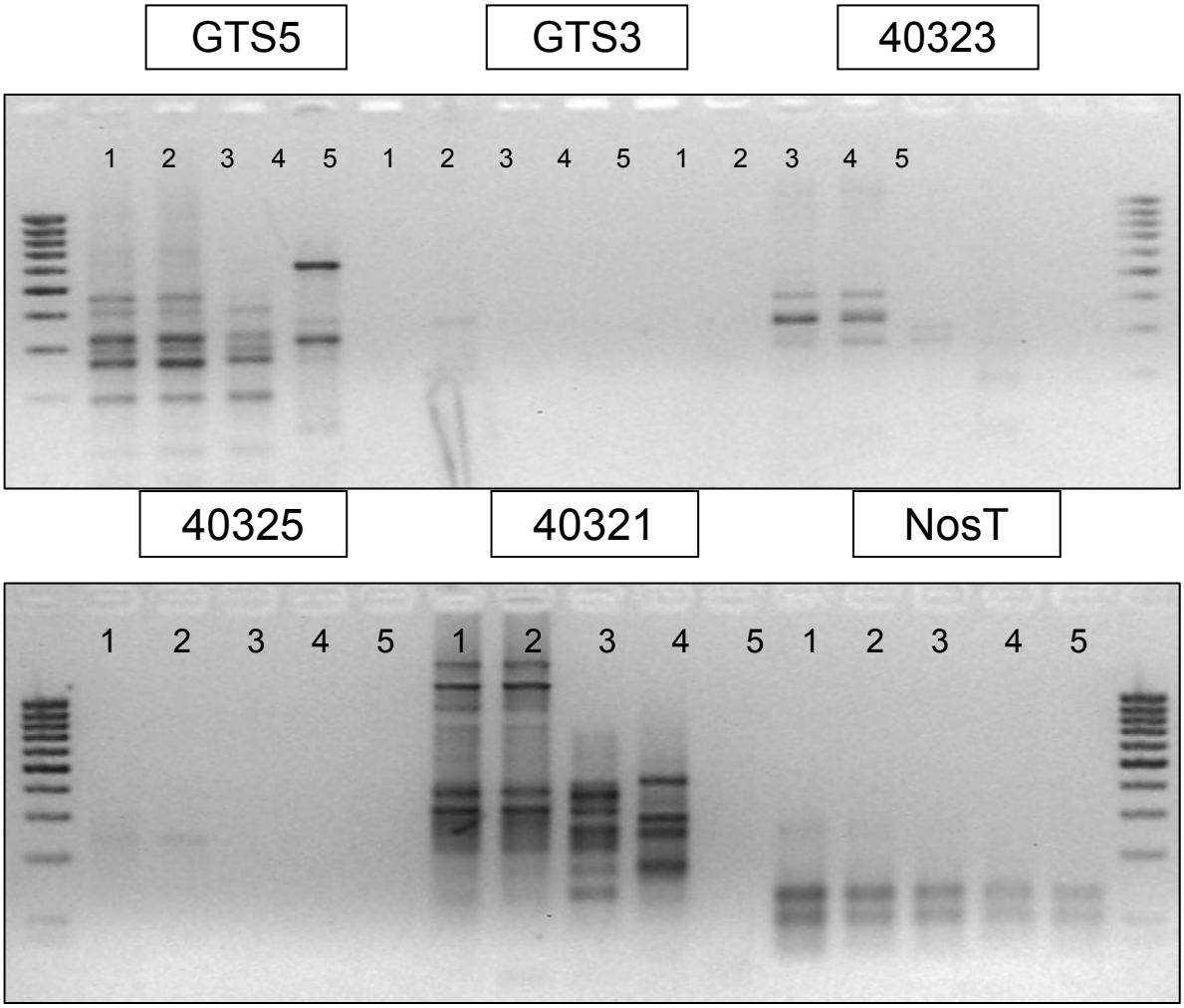


Figura 9. Geles de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio donde se observaron las amplificaciones desarrolladas con los pares de partidores diseñados para identificar el evento GTS 40 3-2 resistente al herbicida Roundup Ready ® y los diseñados para el terminador de la nopalina sintasa (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens* (3). Las líneas corresponden a muestra A077 (1), muestra A211 (2), soya convencional no GM (3), maìz convencional no GM (4), control negativo con H_2O (5), se utilizó en todos los casos como estándar de peso molecular ladder 100 bp.

Los métodos empleados para la detección de soya transgénica GTS 40 3-2 resistente al herbicida Roundup Ready ®, resultaron ser apropiados para el empleo en la identificación de muestras con material transgénico de ésta índole, lo cual permitió calificar al Laboratorio de Biotecnología, del Centro Regional de Investigación (CRI) del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA-LaPlatina), como apto para clasificar dicho material, y acreditarlo como tal mediante la APLAC.
Se anexa el Informe Final del Proceso en separata digital, siendo el código del Laboratorio 038.

3.2. Problemática encontrada y adaptación de metodologías.
Las metodologías arriba señaladas corresponden a protocolos consolidados, completamente adaptados y mejorados a la metodología del estado del arte. Una de las principales razones para esta discrepancia ha sido la falta de reproducibilidad encontrada en las publicaciones del estado del arte, lo que obligó al diseño de nuevos juegos de primers y modificación de las condiciones de PCR.
En el caso de los desarrollos propios, las metodologías son inéditas, por lo que existe, en el transcurso de este proyecto, gran cantidad de metodología y protocolos de desarrollo propio.

3.3. Actividades y tareas ejecutadas para la consecución de los objetivos.
Las actividades ejecutadas se pueden dividir operacionalmente en tres:

a) Actividades relacionadas con trazabilidad de semillas e interacción con SAG.
Éstas se relacionaron con procurar una interacción adecuada con el grupo técnico de SAG-Lo Aguirre, con miras a la implementación de las metodologías de trazabilidad de semillas en esa sede. Involucró un sinnúmero de reuniones a distintos niveles y la discusión con encargados de turno sobre los resultados derivados de los ensayos realizados.

b) Actividades relacionadas con flujo génico e interacción con CALT-SAG.
Este conjunto de actividades se relacionó con la coordinación de las salidas para prospecciones de temporada, puesta en marcha de los sistemas de muestreo y coordinación con el envío y manejo de muestras desde el campo hasta el laboratorio. También consideró reuniones con personal SAG que trabaja en regiones dentro del marco de la supervigilancia de las cuarentenas ordenadas por CALT.

c) Actividades de desarrollo de metodologías propias.
Este conjunto de actividades es en sí una mezcla de las anteriores, en donde además se buscó de manera permanente, alternativas de funcionamiento y optimización de los mejores protocolos experimentales, de manera de alimentar la metodología a utilizar en las otras dos áreas del proyecto (trazabilidad y flujo génico). Este conjunto de actividades se desarrolló plenamente en La Platina y fueron decisiones tomadas esencialmente por el Investigador Responsable del Proyecto.

4. Resultados del proyecto por objetivos.

4.1. Desarrollar un sistema de trazabilidad de material tipo GMO ingresado al país.

Se establecieron líneas de trabajo para la detección de mezclas adventicias en maíz y soya. Para esto, se incluyeron los eventos transgénicos:

- maíz:
  - MON 810
  - MON 863
  - NK 603
  - GA 21
  - Hembra MON 810 x Macho MON 863

- soya:
  - 40-3-2

De manera gráfica, la metodología utilizada se expone en la Figura 10 y se ha descrito previamente en los Informes Técnicos.

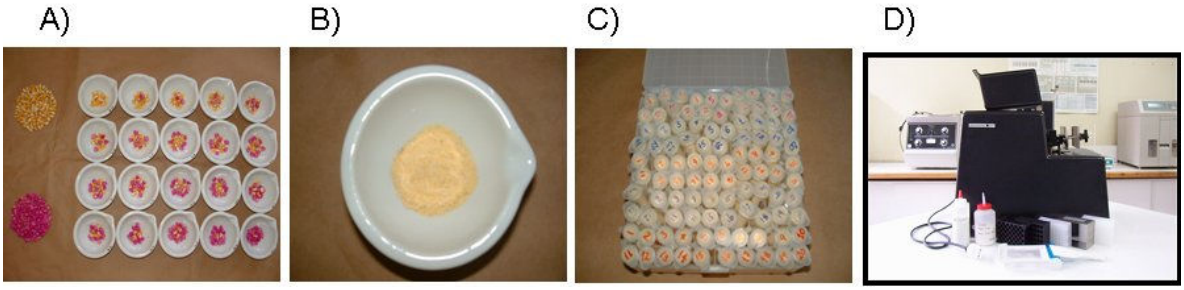


Figura 10. Representación gráfica de la elaboración de lotes y su procesamiento para curvas de calibración. A, generación de lotes de 20 semillas; B, molienda utilizando molinillos de granos; C, extracción de DNA desde los lotes; D) equipo automático de molienda MINI-BEADBATER (Biospec Products).

Esta metodología se encuentra disponible para su implementación en SAG-Lo Aguirre, contándose en ese centro con un molinillo y vasijas autoclavables *ad hoc* para el sistema. Una garantía de la funcionalidad y utilidad de las metodologías implementadas viene del positivo resultado en la acreditación APLAC Proficiency Test 034, llevada a cabo durante 2004 y expuesta en detalle en Metodología.

En la Figura 11 se muestra un grupo de muestras tipo ingresadas a la trazabilidad de laboratorio, en este "set" de muestras se incluyeron maíz y soya.

Figura 11. Muestras recibidas en SAG-Lo Aguirre para trazabilidad de semillas.

Un resultado tipo se muestra en la Figura 12, donde se muestran amplificaciones correspondientes a una muestra de maíz, evaluando específicamente el gen introducido (transgén) y no las secuencias promotoras.

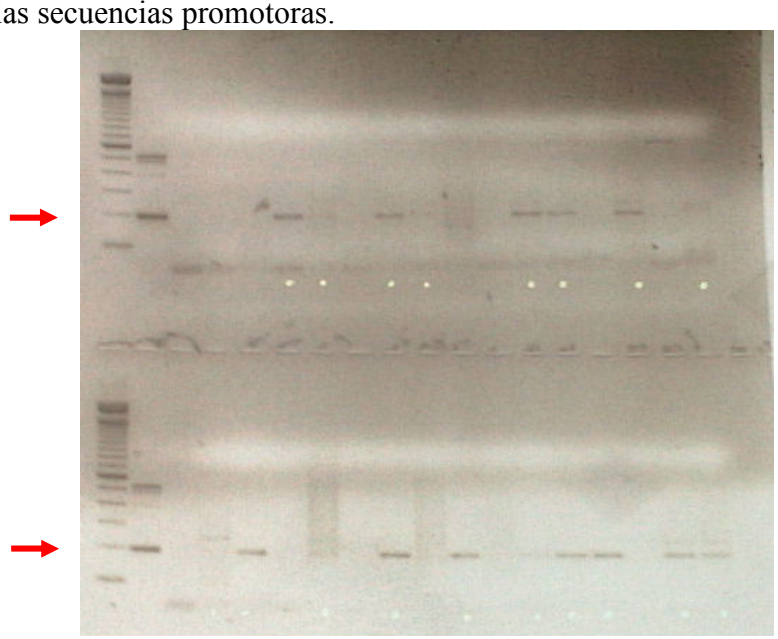


Figura 12. Amplificación por PCR de DNAs de canola utilizando primers específicos para el transgén. Las flechas indican posición del amplicón para muestras positivas.

4.2. Desarrollar un sistema de evaluación del impacto de plantas transgénicas importadas y desarrolladas en el país sobre especies silvestres relacionadas de interés nacional.

4.2.1. Sistema de *Brassica* spp.

4.2.1.1. Detección de triploides y transgén.

Tras cuatro años de prospecciones, los resultados generales de 22 predios analizados entre la RM y la IX Región se resumen en la siguiente Tabla 5.

Tabla 5. Muestras totales evaluadas para *Brassica* spp en el proyecto.

Totales	Diploides	Tetraploides	Triploides
1963	957	943	63
100	49	48	3

De esto se deduce que, tras tres temporadas de colecta, se rescató un total de 1963 individuos de los cuales un 3% mostraron ser triploides tras la aplicación de citometría de flujo.

La detección específica para transgenes en estos individuos, mostró que todos ellos habían incorporado el transgén correspondiente al campo GM correspondiente. La totalidad de los transgenes detectado correspondió al gen *epsps* (*A. tumefaciens*) y *gox* (*Ochrobactrum anthropii*), los que otorgan tolerancia a glifosato (Figura 13).

Figura 13. Detección del transgén en individuos triploides.

Las plantas triploides obtenidas durante las prospecciones, sospechosas de posible escape de transgén de resistencia a Glifosato, que presentaron el fragmento del gen *epsps* se mantuvieron en invernaderos de bioseguridad hasta alcanzar tamaño suficiente para ser tratadas con herbicida Roundup Ready. El seguimiento durante 4 semanas de éstos, utilizando como controles positivos individuos del evento GT 73 (Monsanto) y como controles negativos diversas malezas del género *Brassica*, mostró que en ninguno de los casos evaluados, la incorporación del gen ha resultado en una transferencia de la propiedad de tolerancia al

herbicida, en sus concentraciones de uso comercial (solución al 2% de herbicida Roundup Ready® en razón de 3 L/ha) (Figura 14).

Figura 14. Resistencia a glifosato en controles GM y No GM de *Brassica* spp. Se muestran los controles empleados en ensayo de resistencia a herbicida Roundup Ready®. *Brassica napus* GM previo al ensayo de resistencia (A) y tres semanas después de la aplicación (B), *Brassica rapa* No GM sin aplicación de herbicida (C), y tres semanas posterior al ensayo (D)

Evaluaciones hechas sobre individuos progenie de estos triploides también mostraron que éstas no fueron capaces de tolerar la aplicación del herbicida.

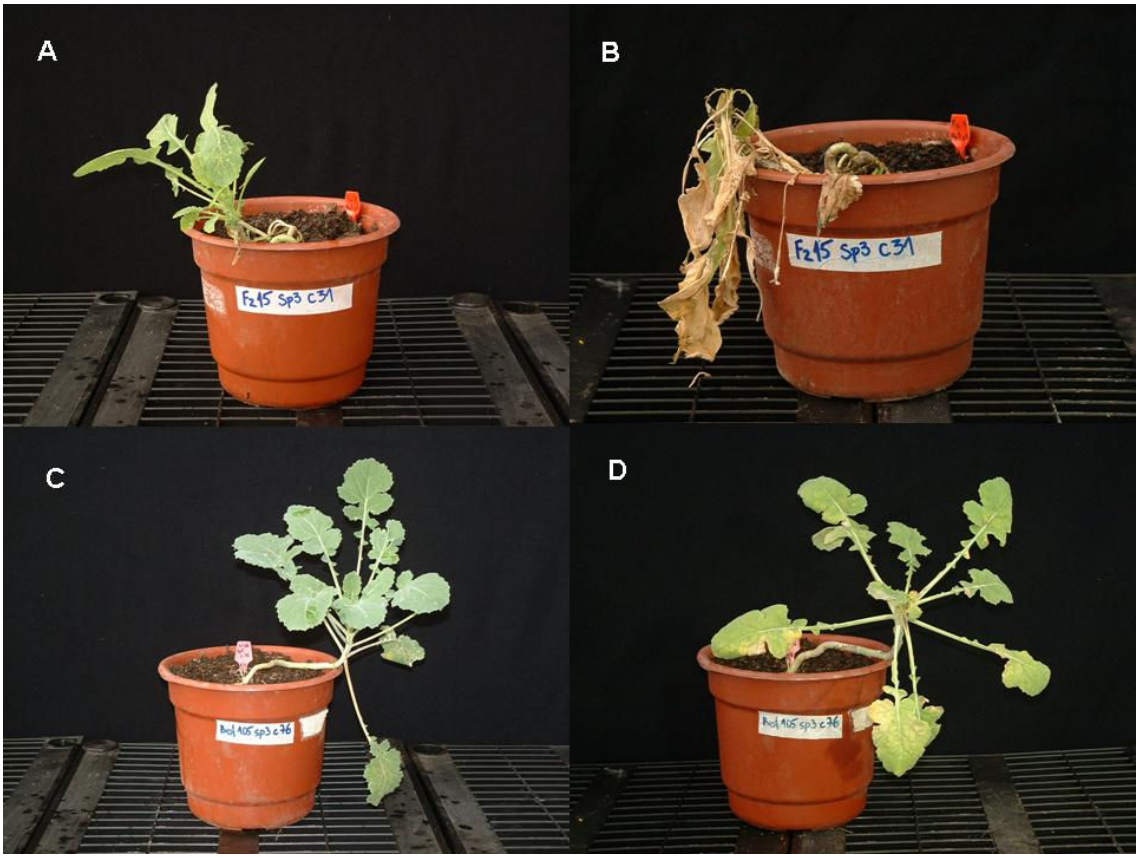


Figura 15. Resistencia a glifosato en individuos híbridos de *Brassica* spp. Ensayo de resistencia a herbicida Roundup Ready®. A modo de ejemplo se muestra en A una planta triploide F_2 previo al ensayo y el resultado de susceptibilidad en el cuadrante B. Por su parte una planta triploide F_1 sin aplicación de herbicida (C) y en al cuadrante D se observa el resultado de resistencia 3 semanas después de la aplicación.

4.2.1.2. Especies involucradas en el cruzamiento inter-específico y sentido.

En líneas generales, el sentido de hibridación de estos individuos triploides se ha juzgado como *B. rapa* x *B. napus*, como ha quedado evidenciado por la utilización de marcadores nucleares tipo ISSR (Figura 16) y cloroplásticos (Figura 17).

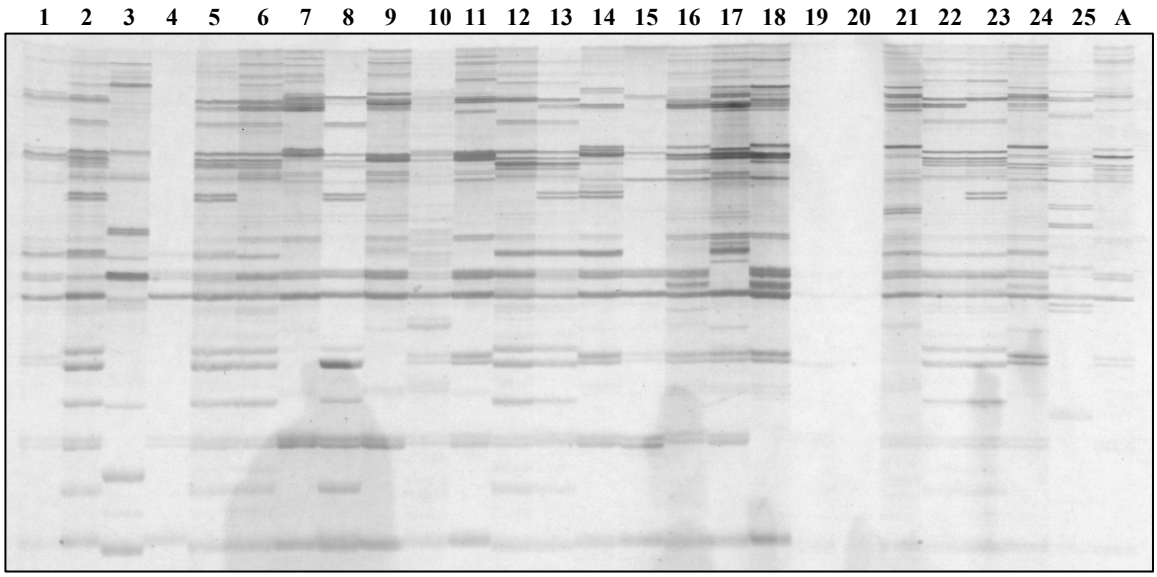


Figura 16. Patrones de amplificación de ISSR utilizando el partidor 888 en DNAs de *Brassica* e individuos potenciales híbridos colectados en un campo de segundo año de cuarentena localizado en Vilcún. Las muestras 1, 2 y 3 corresponden a *B. rapa* (AA)*, B. napus* (AACC) y *B. oleracea* (CC), respectivamente.

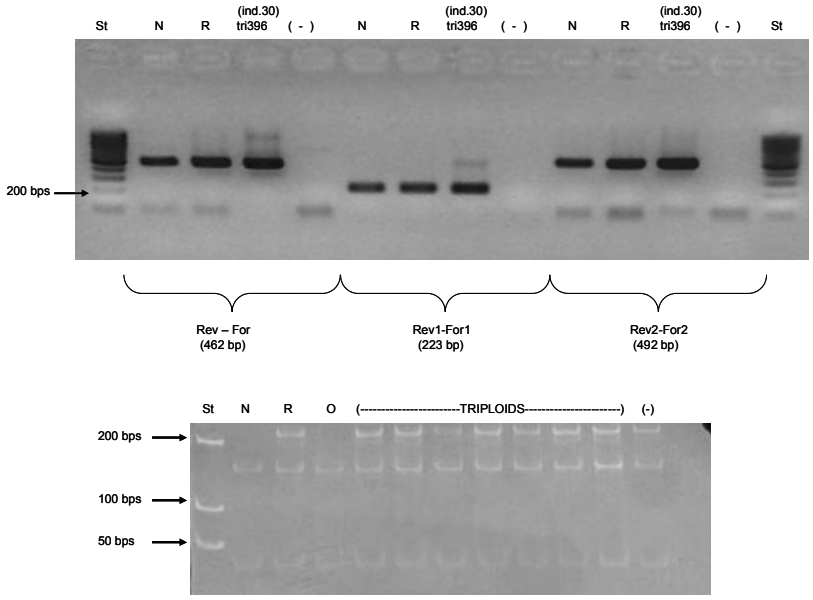


Figura 17. Uso del gen *ATPase* (correspondiente a la alpha-subunit de ATP synthase gene) como herramienta para el reconocimiento de herencia maternal en plantas triploides. Arriba, evaluación para 3 primer sets (Rev-For, Rev1-For1, and Rev2-For2) generando sus correspondientes bandas de PCR; abajo, digestión *Alu* I del fragmento Rev1-For1. N, *B. napus*; R, *B. rapa*; O*B. Oleracea*; tri, individuo triploide.

El uso de ISSRs, ha permitido demostrar la suma de los patrones individuales de amplificación de *B. napus* y *B. rapa* en los individuos triploides encontrados (esto además está en confirmación y consolidación para manuscrito en preparación). De forma adicional, el uso de marcadores cloroplásticos tipo CAPS, ha confirmado la herencia materna en estos individuos como específicamente referida a *B. rapa*. Estos antecedentes permiten aseverar que esencialmente los individuos colectados han incorporado el transgén en su F0 y que éstos derivan de la cruza *B. rapa* x *B. napus*.

4.2.2. Sistema de *Zea mays.*

4.2.2.1. Análisis de viabilidad de polen.

A continuación se muestran los resultados procedentes de los estudios de viabilidad de polen para variedades GM utilizadas en los semilleros nacionales. La Tabla 6 muestra estos resultados generales finales para viabilidad de polen en dos condiciones controladas (6a y 6b).

Tabla 6a. Viabilidad de polen. Conteo de viabilidad a 54% humedad relativa, 25° C a 1, 2 y 3 horas.

Tiempo	1 horas		2 horas		3 horas	
Estado	Viable	Inviable	Viable	Inviable	Viable	Inviable
Nº de granos	21	7	7	3	1	16
	10	2	4	6	1	7
	15	1	3	5	2	23
	9	10	10	2	5	19
	8	12	15	10	26	40
	10	8	4	1	20	7
	22	6	1	7	29	9
	2	4	4	3	4	3
	2	2	4	4	34	35
	7	12	5	2	5	13
Total	106	64	57	43	127	172
%	**62,35%**	**37,65%**	**57,00%**	**43,00%**	**42,47%**	**57,53%**

Tabla 6b. Viabilidad de polen. Conteo de viabilidad a 65% humedad relativa, 21° C a 1, 2 y 3 horas.

Tiempo	1 horas		2 horas		3 horas	
Estado	Viable	Inviable	Viable	Inviable	Viable	Inviable
Nº de granos	13	9	21	15	8	8
	2	4	2	3	6	11
	8	2	9	6	1	9
	3	1	22	14	6	10
	4	4	21	9	3	6
	2	1	16	7	3	9
	4	4	9	12	6	17
	15	13	5	14	2	5
	9	1	2	5	1	5
	10	4	0	0	2	10
Total	70	43	107	85	38	90
%	**61,95%**	**38,05%**	**55,73%**	**44,27%**	**29,69%**	**70,31%**

Estos resultados pueden esquematizarse a través de la gráfica ilustrada en la Figura 18.

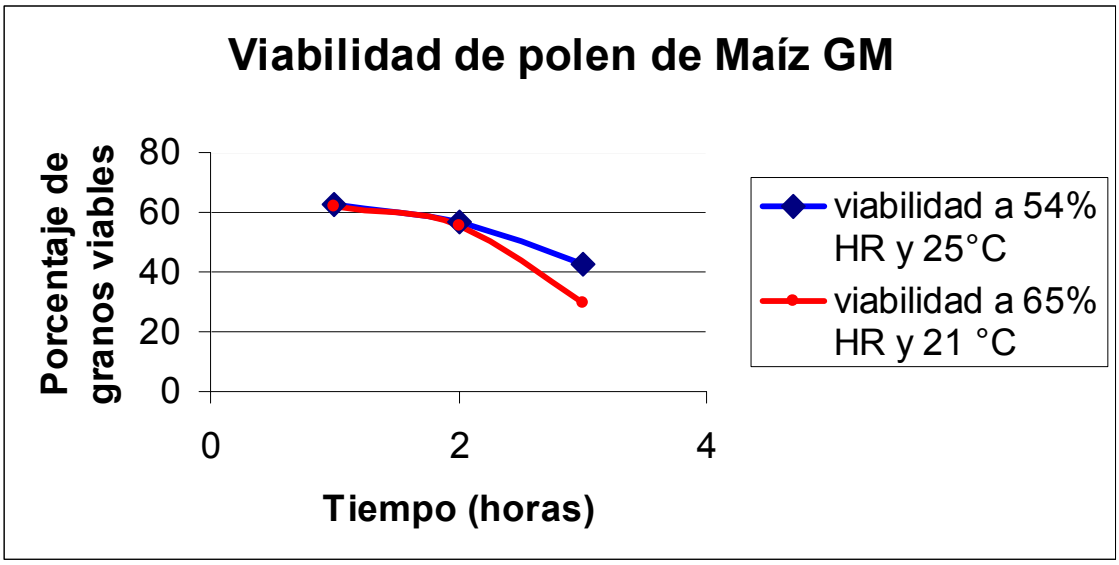


Figura 18. Gráfico de viabilidad de polen de maíz GM en función de la temperatura, HR y el tiempo. Se aprecia la notable disminución de la viabilidad en el tiempo a pesar de que las condiciones dispuestas no eran demasiado extremas, en donde la viabilidad a 54% HR y 25ºC (línea azul) bajo desde un 62,35% HR a un 42,47% HR y 65% HR y 21ºC (línea roja) bajo desde un 61,95% HR a un 29,69% HR, ambos en un tiempo de 3 horas.

4.2.2.2. Flujo génico en barreras de contención de campos comerciales de maíz.
Como se informó en el transcurso de proyecto, la realidad cuarentenaria o de biovigilancia para maíz involucra el establecimiento de líneas de contención con maíz no GM. Según esta propiedad, el proyecto trabajó en determinar los porcentajes de flujo y polinización cruzada en estas líneas de protección. En la Figura 19 se muestra un campo ideal en donde puede verse el efecto de los diversos factores ambientales sobre la polinización en las líneas barrera.

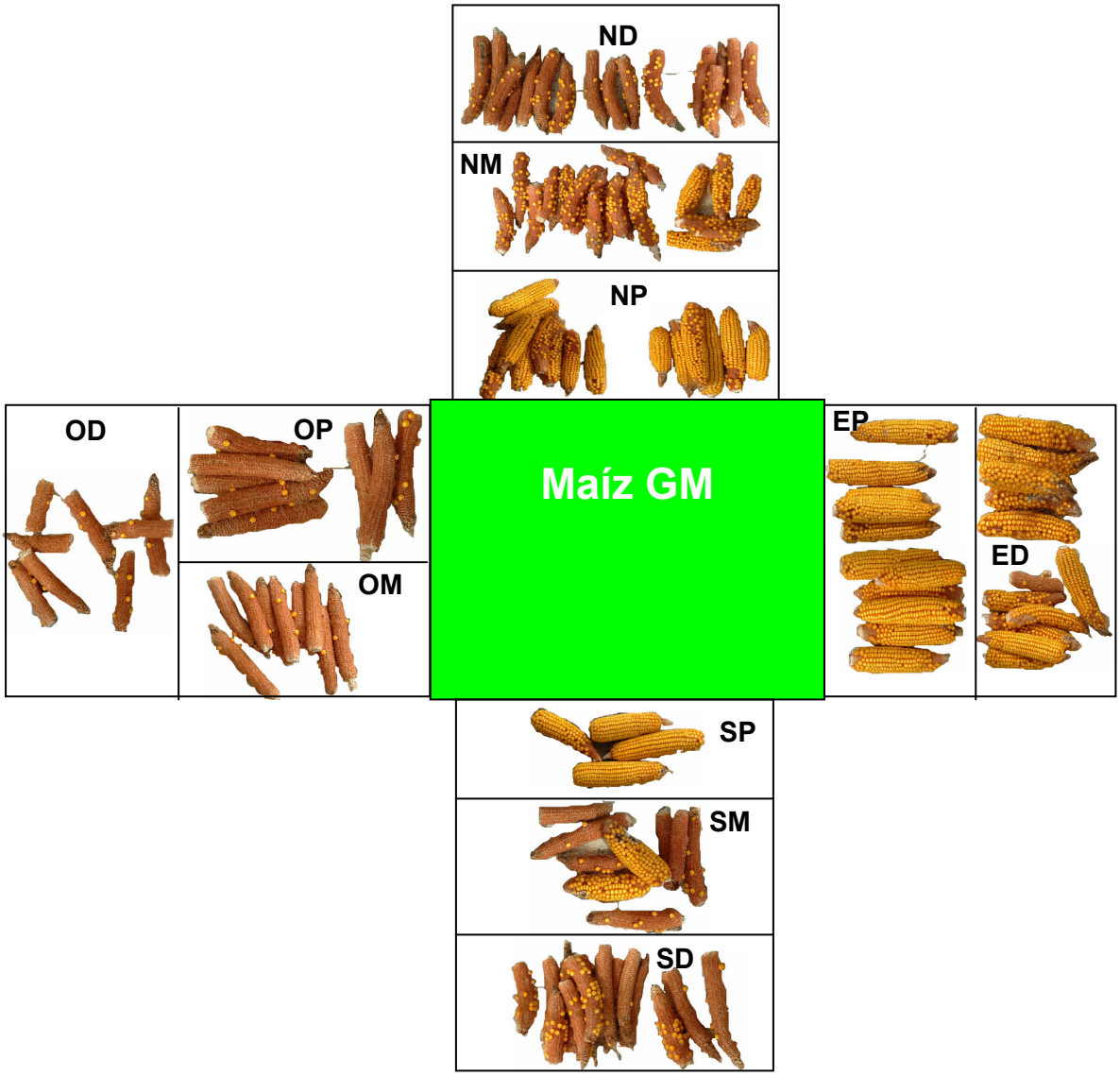


Figura 19. Productos de polinización en un campo ideal de maíz GM. Puede verse el efecto orientación sobre los individuos producidos. N, S, E y O, puntos cardinales; P, proximal, M, medio y D, distal en distancia respecto del centro GM.

El análisis de estas barreras, en función de la orientación y la distancia al centro GM, ha permitido establecer porcentajes de flujo. Para la evaluación de la presencia de flujo del transgén de resistencia a Glifosato se diseñaron partidores específicos para el gen *epsps* de la cepa cp4 de *Agrobacterium tumefaciens*. Los partidores de trazabilidad utilizados en la identificación de los bulks GM (+) se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Primers para detección de transgén en maíz. Partidores diseñados para la detección del *epsps* de la cepa cp4 de *Agrobacterium tumefaciens*.

Nombre Partidor	**Secuencia**	**Tamaño del fragmento (bp)**
EPSPS II For.	5' CGC GTG CTG AAC CCG TTG 3'	
EPSPS I Rev.	5' CGT GCG ACC GCT GCC AGA 3'	695 bp

Se realizó la evaluación de cada uno de de los sectores de los cuales existieron muestras de los distintos predios mediante amplificación por PCR del transgén *epsps*, el cual se escrutó según presencia (1) o ausencia (0) de éste en las muestras en cuestión. Un gel y tabla modelo se observan a continuación en la Tabla 8 y en la Figura 20.

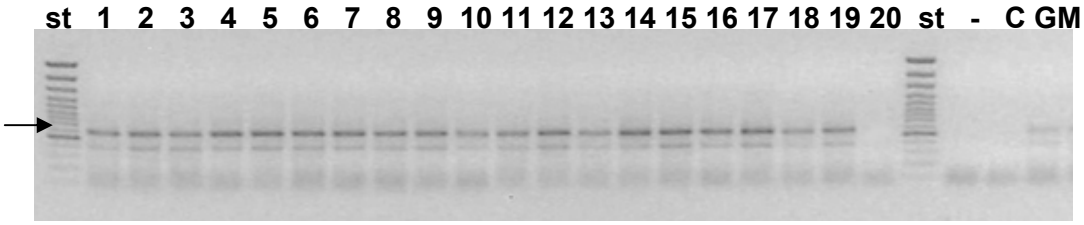


Figura 20. Detección transgén en maices localizados en la barrera de contención. PCR del sector NM en las cual se muestra la banda corerspondiente al gen *epsps* de 695 pares de bases (flecha) para las 19 primeras muestras, y en el carril número 20 la no presencia de ésta, y en los carriles posteriores al marcador estándar de peso molécular (st) se muestran los 3 controles agua (-), maíz convencional (C) y el control positivo de maíz transgénico (GM).

Tabla 8. Agrupamiento de resultados de análisis dem uestrasde maíz.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Norte																					
NP	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	
	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	
NM	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
ND	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	
Sur																					
SAP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
SBM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SAD	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Este																					
EP	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	
EM	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	
Oeste																					
OAP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	
	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
OAM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
OAD	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	

Resultados del análisis de PCR específico del gen *epsps* a las muestras recolectadas desde la barrera de contención de maíz convencional que rodeaba al cultivo de maíz genéticamente modificado, donde para cada sector se muestran dos series del 1 al 20 que son indicativos de cada "*bulk*" al cual se le realizo el PCR formando un total de 40 "*bulk*" analizados para cada sector y las siglas en la columna de la derecha corresponde a las siglas de utilizadas para cada sector.

Así, se establecieron resultados de flujo para barreras de contención de diversos campos, de distintas geometrías. Las siguientes figuras permiten esquematizar dichos resultados (Figuras 21 y 22).

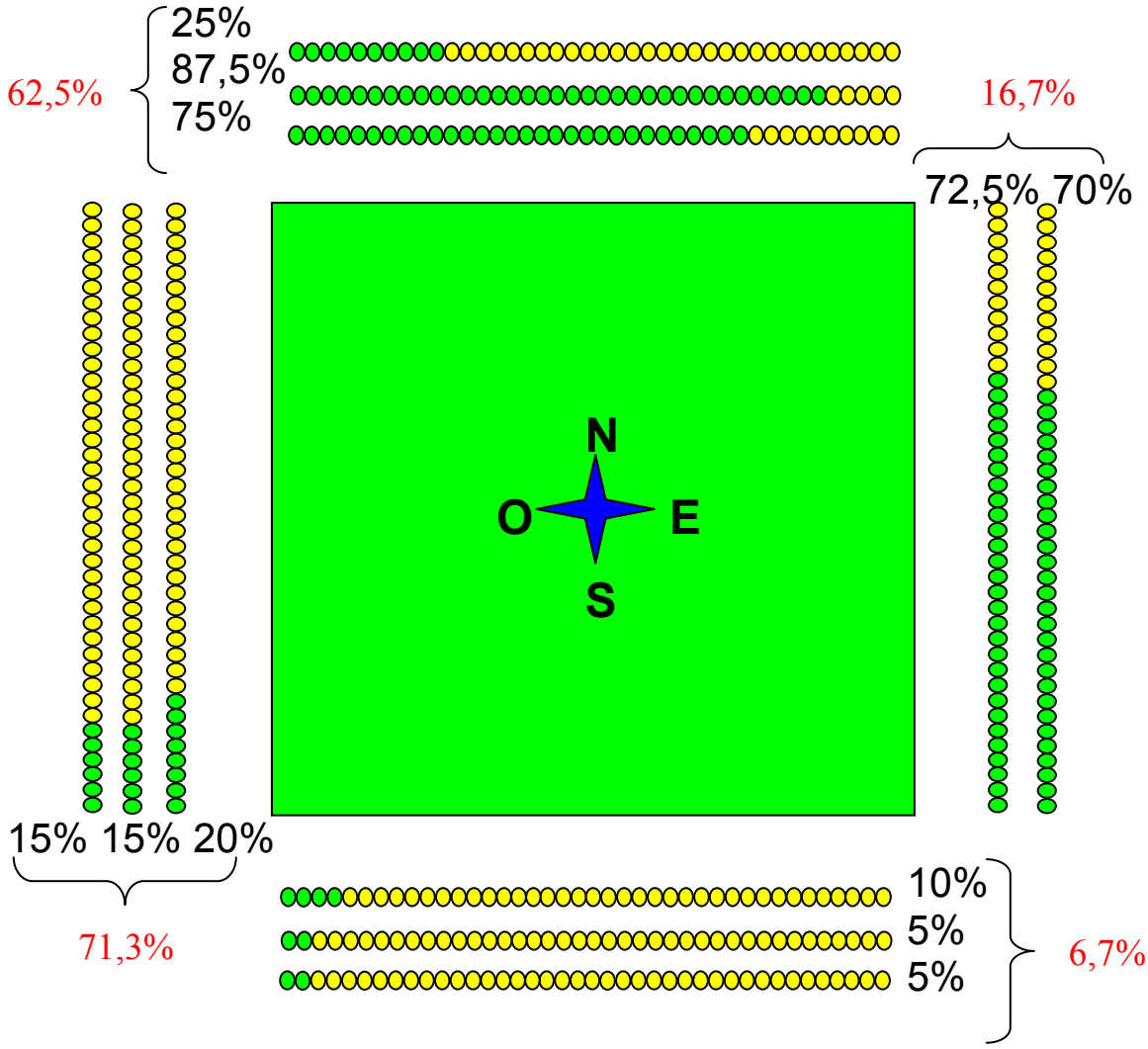


Figura 21. Campo GM de maíz 1. Se presentan los resultados de la tabla 4.10, en forma esquemática según fueron realizadas las prospecciones de campo, donde el cuadrado verde del centro representa el campo productor de polen transgénico, las hileras circundantes representa las barreras de contención de maíz convencional y los puntos de colores representan los "*Bulk*" analizados por PCR, donde el color amarillo indica "*Bulk*" sin la presencia de flujo génico y por el contrario el verde indica la presencia de flujo génico del gen *epsps*.

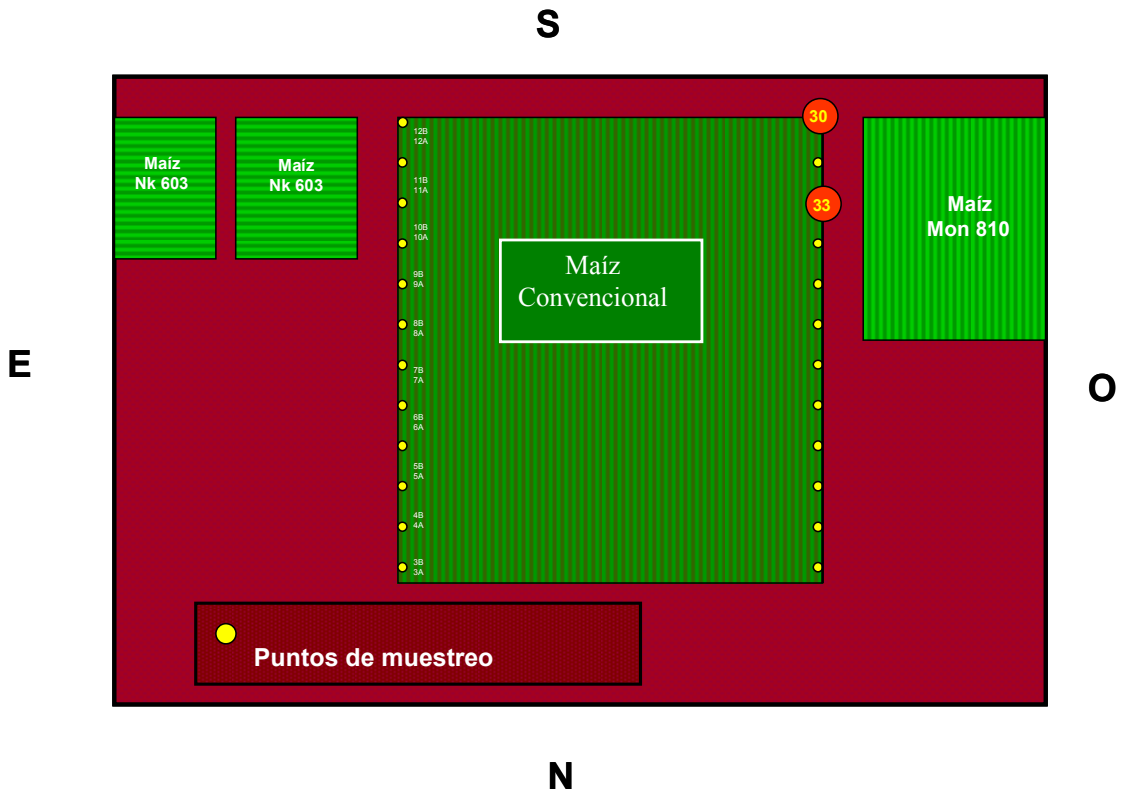


Figura 22. Campo GM de maíz 2. De cada uno de los sectores muestreados (círculos amarillos) fueron extraídas 2 mazorcas y de cada una de estas se realizó un submuestreo al azar del 5% (p/p) de éstas. Los círculos rojos con números indican el flujo génico detectado para MON 810 sobre Convencional. En el caso de los eventos NK603 y su flujo hacia los campos aledaños, éste no se registró en ninguno de los puntos de muestreo. Se indican los puntos cardinales.

4.2.3. Sistema de *Solanum* spp.

La estrategia en papa (aún en ejecución) se ha abordado de un modo integral. Esto ha llevado al abordaje de temas moleculares y de temas agronómicos en forma paralela, según la línea de trabajo de la Figura 23.

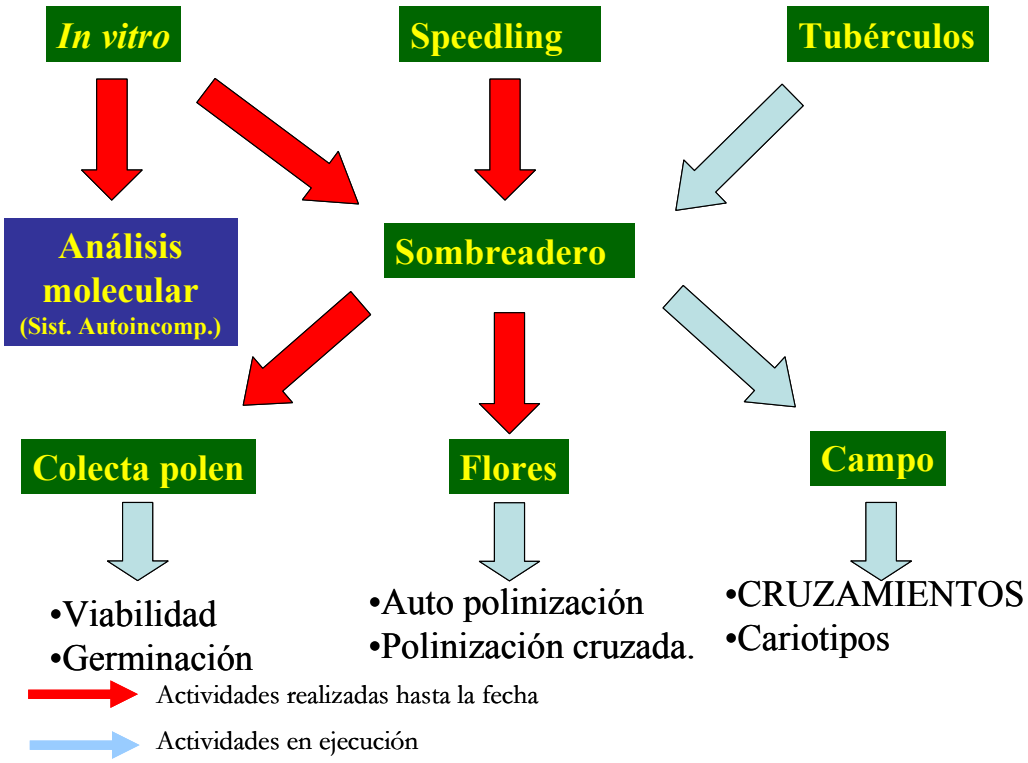


Figura 23. Sistema de *Solanum* spp. Plántulas generadas en *in vitro* y tubérculos son dirigidas a dostipos de análisis: a) evaluación de cruzas en campo y b) análisis molecular del sistema de autoincompatibilidad sexual (del mismo modo comose hizo para *Brassica* spp. (ver aplicación de patente y anexo de manuscrito preparado). Se indican los análisis planificados en el fondo de la figura y su estado de avance.

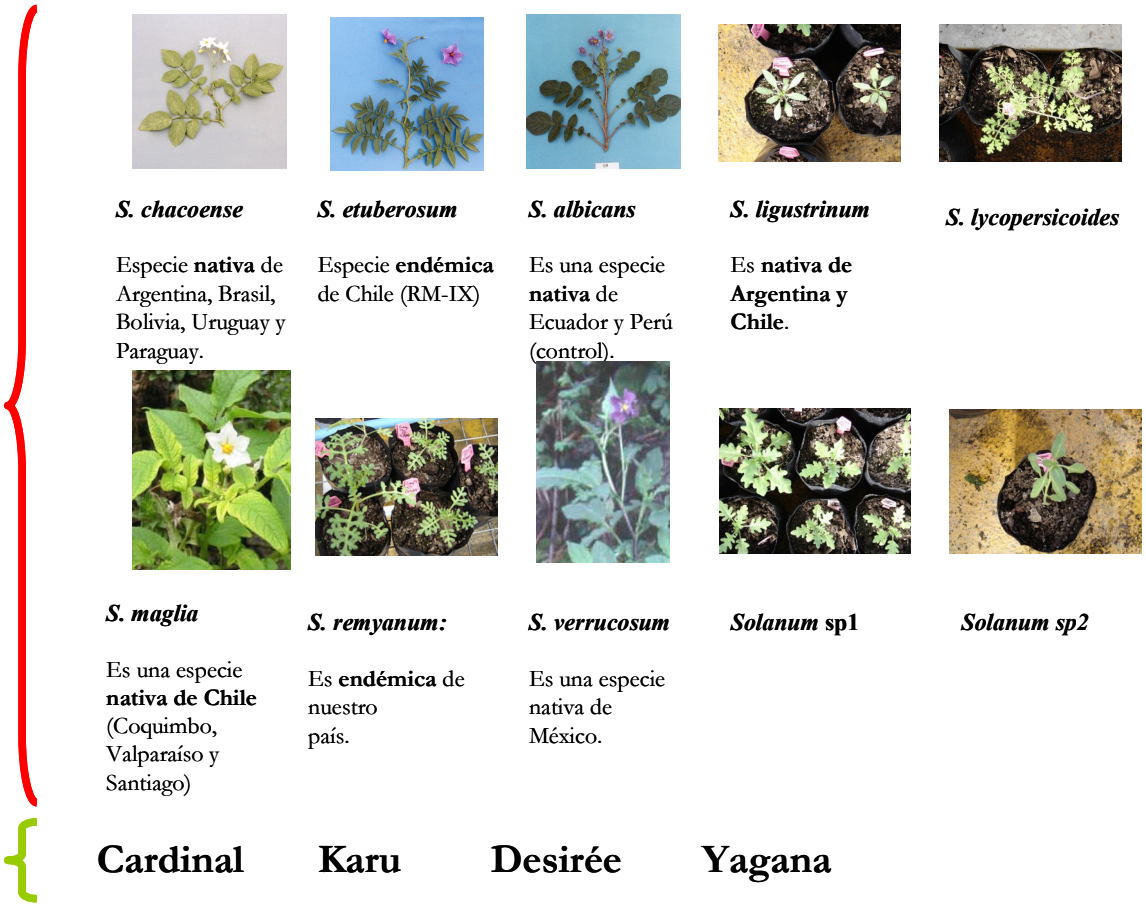


Figura 24. Especies incluidas en el estudio de flujo génico en papa. Llave roja, especies de interés de biodiversidad y en verde, especies o variedades comerciales.

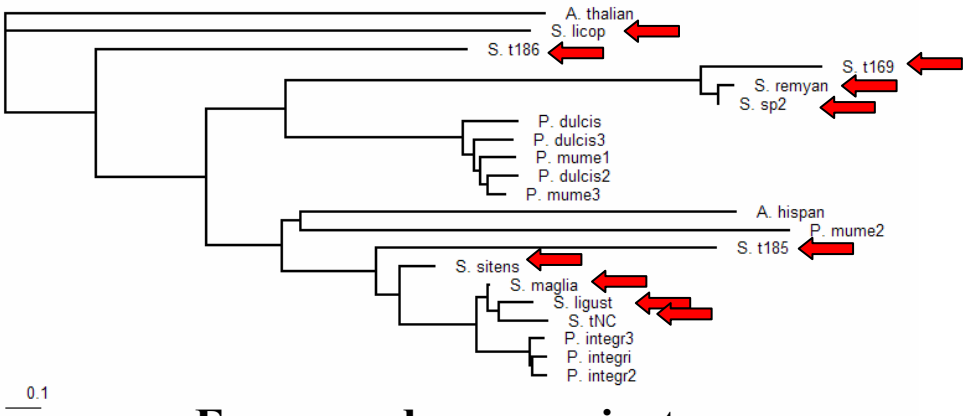
Las especies incluidas en este estudio, derivaron de un modelamiento utilizando la base de datos generada también en actividades relacionadas al proyecto. Así, las especies utilizadas en este análisis se muestran en la Figura 24.

4.2.3.1. Estudio de filogenia sobre secuencias tipo F-box en *Solanum* spp.

Uno de los sistemas guía utilizados en el transcurso del proyecto fueron los de autoincompatibilidad sexual. En el caso de *Solanum*, el sistema recurre a la degradación por una SRNAse de componentes RNA del tubo polínico, a medida que crece o desarrolla en el estigma. Uno de los componentes descritos en este sistema de autoincompatibilidad es el *F-box*, que estaría ubicado como componente del polen (al contrario del *SRK* estigmático de *Brassica*).

De esta forma, se inició un estudio molecular que intentara relacionar molecularmente las similitudes entre distintos *F-box* de las especies estudiadas. Las secuencias obtenidas en la etapa previa de clonamiento de fragmentos amplificados con los partidores diseñados desde secuencias descritas conocidas para el gen del polen tipo F-box correspondiente al gen del polen-S involucrado en la reacción de auto incompatibilidad y se seleccionaron aquellos que amplificaran un fragmento de 596 pares de bases, obteniendo fragmentos efectivos para las distintas especies del género *Solanum* de 596 pb (Pis 3) correspondiente a la secuencia ubicada entre los residuos 457 y 1058 de la secuencia tipo F-Box de *Petunia integrifolia*, y de 232 pares de bases (pis 2) correspondiente a la secuencia ubicada entre los residuos 780 y 1012; las cuales fueron analizadas bajo el programa BioEdit (University of Washington, Seattle, WA).

El resultado de estas comparaciones moleculares se muestra en la Figura 25, lo que ha permitido generar grupos de especies, las que molecularmente estarían más emparentadas que otras de otras ramas generadas en el árbol filogenético que se muestra.



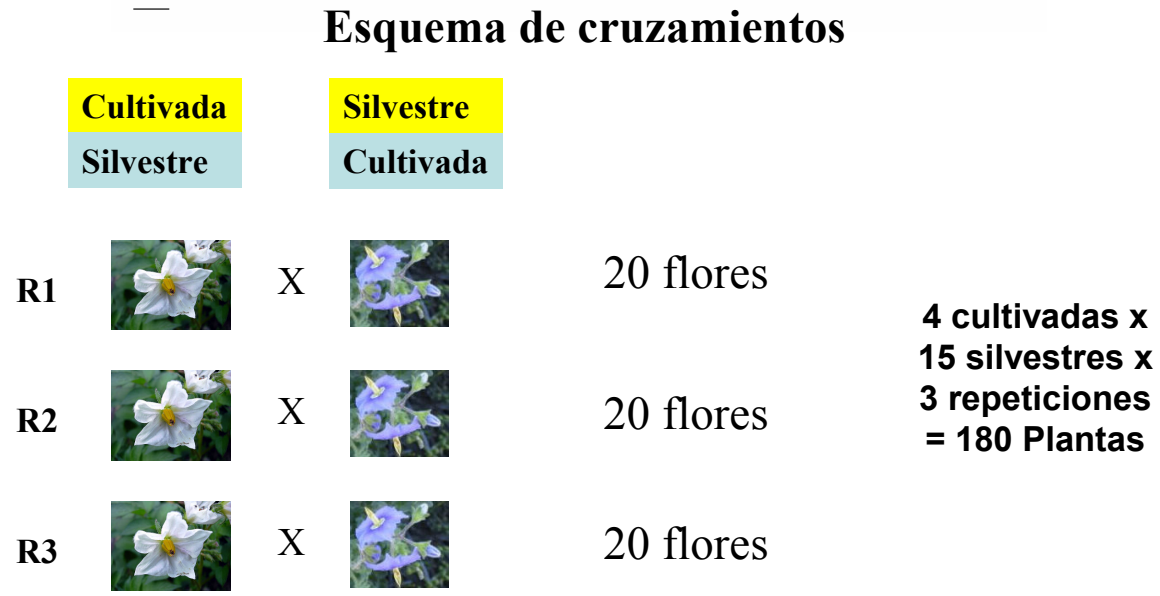


Figura 25. Relación molecular inter-específica y cruzamientos planificados para el estudio en papa. Arriba, relaciones moleculares de los genes *F-box* entre las distintas especies consideradas en el estudios de *Solanum* spp. Abajo, línea de trabajo programático llevado a cabo para evaluar la relación entre similitud molecular de *F-box* e hibridación cruzada inter-específica.

El paso actual es corroborar o relacionar estas similitudes moleculares con tasas reales de polinización cruzadas, trabajo actualmente en marcha en INIA-La Platina.

5. Perspectivas del rubro luego del proyecto.

La experiencia adquirida durante este proyecto permite continuar con el sistema de trazabilidad molecular y expandirlo hacia el área del control de la pureza genética. La pureza en el mercado de semillas es un requerimiento indiscutible del sector. Sin duda, la co-existencia es un factor técnico que viene a desafiar este requerimiento de los productos de este mercado. El uso de semillas con identidad preservada y semillas e incluso mezclas de semillas certificadas, son condiciones que el mercado está demandando para estos "commodities" alimenticios.

La trazabilidad genética de semillas como una plataforma de soporte productivo, es un proceso factible de aplicar en Chile. En ella se debe incluir la evaluación del comportamiento en campo entre nuevos eventos e incluso entre especies. La posibilidad de alterar la pureza genética de una producción determinada de semillas se relaciona con: a) el efecto de un sistema agrícola sobre otro (cuánto contamina un predio GM a uno orgánico y/o viceversa), b) el efecto del agroclima específico sobre la capacidad natural de interacción entre estos eventos (relación zona productiva-zona agroclimática-comportamiento del individuo específico) y c) la cadena de manejo post-cosecha que reciben las semillas desde el campo hasta su sitio de embarque o comercialización.

En la actualidad se está aplicando para la presentación de un nuevo proyecto de continuación de la línea ya ejecutada, pero con el concepto de escalamiento de lo ya hecho. Este proyecto propone dar respuestas técnicas para el soporte de estos tres puntos críticos de la producción de semillas, a través de la generación de información de la vida real sobre flujo génico en función del agroclima para especies específicas, acumulación de esta información en base de datos computacional, modelamiento y simulación de estos procesos biológicos, generación de un sistema utilitario a través de servicios Internet escalonados (según nivel de usuarios) y paralelamente, genera una capacidad técnica instalada que permita verificar esta trazabilidad molecular, que permita la certificación (obligatoria y/o a requerimiento por servicio), a través de un laboratorio específico para determinación de pureza varietal y detección de material GM. Así, las perspectivas del rubro apuntan a que éste, en el corto plazo, disponga de tres tipos de productos: a) un laboratorio de servicios para detección de material transgénico y pureza varietal, b) bases de datos con resultados de comportamiento biológico-climático para especies productivas y c) sistemas de modelamiento y predicción para la base de co-existencia entre tipos de agricultura. Todo esto en base a lo ya hecho en el presente proyecto.

6. Problemas enfrentados durante la ejecución del proyecto (legales, técnicos, administrativos, de gestión) y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

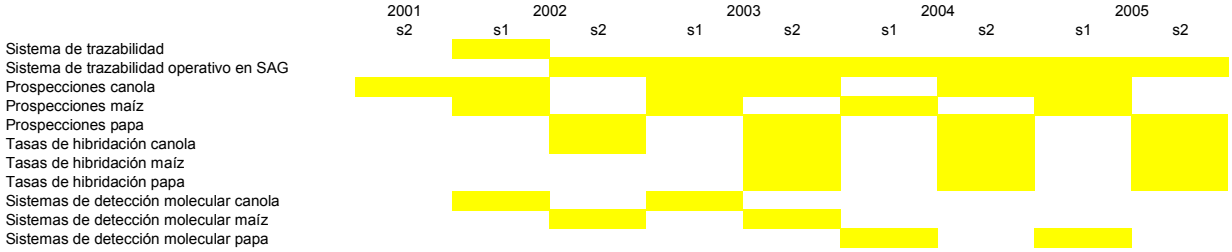
El proyecto debió enfrentar numerosos problemas de tipo administrativo interinstitucional. Todos ellos se superaron también con el transcurso del tiempo, pero sin duda que esto influyó enormemente en la consecución plena del Objetivo Específico 1.

Todos los problemas se abordaron en su tiempo, incluso con la generación de un "Directorio".

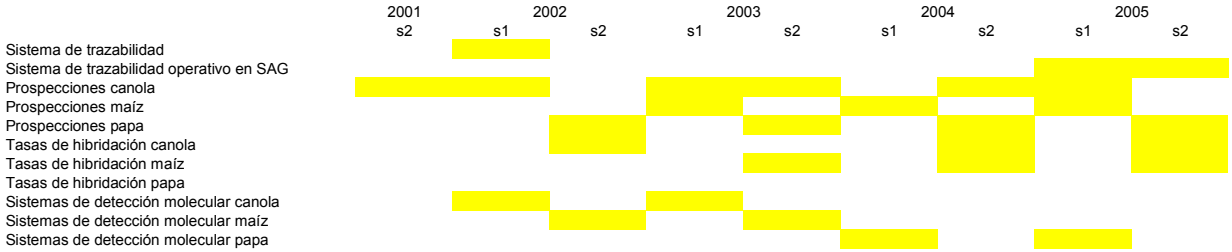
Sin embargo, estos problemas también significaron avances sustanciales en el proyecto, como lo fue la adición de recursos extra para compra de equipamiento capaz de sostener la intensidad de trabajo actual y futura-cercana, que sin duda vendrá en los próximos meses, cuando en SAG-Lo Aguirre se habilite el edificio y laboratorio destinado a biotecnología.

7. Calendario de ejecución (programado, real) y cuadro resumen de costos (programados, efectivos) del proyecto.

Actividades Generales Programadas:



Actividades Generales Realizadas:



Las actividades programadas y realizadas han sido reagrupadas a lo mostrado en las figuras superiores. En primer lugar, la planificación de dejar instalada la metodología de trazabilidad en SAG no resultó debido a las causas señaladas en el punto anterior.

Otro punto importante de cambio en las actividades originalmente planeadas viene del resultado de las prospecciones derivadas del primer año, en donde canola fue casi el blanco exclusivo de los análisis realizados por el proyecto, debido a la gran cantidad de individuos colectados (centenares). Esto obligó a retrasar el comienzo de las prospecciones de maíz, en donde el

problema técnico no era mayor, pero sí el número de muestras obtenidas por campo (miles). De esta forma, maíz partió con un año de retraso.

Con respecto a papa, la primera prospección fue en el semestre 2 de 2003, debido a que la realidad de este cultivo, en su condición de GM, no tenía la magnitud inicialmente esperada.

Los resultados de tasas de hibridación y los sistemas de detección se obtuvieron de forma más o menos planificada, con un retraso de actividades para maíz, debido a las exigencias técnicas de canola. Pese a esto, el estado final del proyecto es de generación de nuevas metodología inicialmente no planeadas, lo que incluye la elaboración de publicaciones y una patente de invención.

Finalmente, en el caso de papa, los experimentos de trazabilidad y polinización cruzada están en marcha, en campos de INIA-La Platina y laboratorios y facilidades del laboratorio de biotecnología. Vale la pena señalar que toda la información que se produce en estos momentos debido a estos trabajos es única y no existen antecedentes de trabajos similares en papa.

Costos estimados y reales.

INVERSIONES Y GASTOS TOTALES FIA			
	FIA		
ITEM	Presupuesto al 12/12/05	Gasto desde el Nº 1 al Nº 11	Saldo FIA
RECURSOS HUMANOS			
Profesionales			
Humberto Prieto - INIA Platina - Coordinador	5.707.236	5.707.236	0
Erika Salazar - INIA LA Platina - Coordinador Alterno	2.689.300	2.689.300	0
Técnicos y/o Ayudantes			
S.Diez Simona V.Obreque ($20,111,224 $9,607,611 $ 2,963,617	32.682.946	32.682.452	494
tesista 1 - Felipe Gainza	3.343.582	3.343.582	0
tesista 2 - Manuel Acuña	3.297.434	3.297.434	0
tesista 3 - Erich Palma	3.949.510	3.949.510	0
M.Sole Cabrera	1.042.226	1.042.226	0
Cesar Perez / C. Lagos	2.130.358	2.130.358	0
EQUIPAMIENTO			
Implementación invernadero (acondicionamiento tº)	1.006.490	1.006.490	0
INFRAESTRUCTURA			
Uso invernadero	5.172.701	5.172.701	0
MOVILIZACION, VIATICOS Y COMBUSTIBLE			
Viáticos nacionales, alojamiento y comida	1.988.846	1.988.846	0
Arriendo vehículos	3.107.441	3.107.441	0
Combustibles	1.291.725	1.306.725	-15.000
Peajes	251.070	251.070	0
Pasajes	366.647	366.647	0
MATERIALES E INSUMOS			
Insumos de laboratorio	14.136.308	14.136.308	0
Reactivos de PCR	8.261.349	13.011.593	-4.750.244
Reactivos biología molecular	2.535.714	1.970.566	565.148
Insumos de campo	171.500	171.500	0
Materiales de campo e invernadero	7.584	150.384	-142.800
Otros	441.723	441.723	0
Materiales laboratorio	4.417.401	3.560.189	857.212
PATENTES	2.000.000	1.963.038	36.962
SERVICIOS			
Reparación	464.457	464.457	0
GASTOS GENERALES			
Artículos de librería y Fotocopias	1.680.494	1.783.566	-103.072
IMPREVISTOS	3.363.314	0	3.363.314
OTROS		0	
Gastos generales contabilidad	908.840	908.840	0
TOTAL	106.416.196	106.604.182	-187.986

8. Difusión de los resultados obtenidos.
Se adjuntan las publicaciones realizadas en el marco del proyecto o sobre la base de los resultados obtenidos, el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto.

El proyecto tuvo en su quehacer, una política de confidencialidad. Pese a esto, se han desarrollado tres publicaciones importantes: a) un manuscrito ya elaborado y en etapa de envío, b) una aplicación de patente ya presentada y c) una base de datos electrónica entregada a CONAMA con todas las especies presentes en Chile y con capacidad de modelamiento básico para flujo génico.
Ambos documentos escritos se anexan en el presente informe.

9. Impactos del proyecto.
Descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias.
Los impactos obtenidos son:

- CALT ha incorporado estrategias técnicas derivadas del proyecto.
- SAG instalará físicamente un grupo de Biotecnología que incluirá este trabajo.
- El sector semillero ha requerido reiteradamente seminarios para conocer el tema de flujo génico.
- ANPROS ha decidido apoyar la continuidad de este proyecto a mediana escala en un segundo proyecto a CORFO-Innova.
- Se ha presentado una aplicación de patente de invención en Chile.
- Se ha presentado el trabajo realizado en México y prontamente en Argentina (por invitación especial de CONABIA).
- Se ha puesto a disposición de CONAMA una base de datos de extrema utilidad.

9.1. Impactos y logros: cuadros sintéticos.

9.1.1. Impactos Productivos, Económicos y Comerciales

Logro	***Al inicio del Proyecto***	***Al final del Proyecto***	***Diferencial***
Formación de empresa o unidades de negocio	No existen empresas relacionadas al tema	El proyecto se ha planificado a su escalamiento hacia la producción, entre otros, de un laboratorio de servicios y sitio Internet de información al rubro.	Se ha generado la base para un proyecto de escalamiento hacia resultados-productos de aplicación comercial directa e impacto público a través de la generación de un laboratorio de servicios y sistema integrado de información vía Intertnet.
Producción (por producto)	No existen productos asociados	No existen productos asociados	
Costos de producción	No hay ítems asociados	No hay modificación a lo anterior	El sistema de biovigilancia establece valores de producción relativamente altos en comparación a la agricultura convencional. Pese a esto, las empresas productoras aún contemplan al país como un lugar adecuado para multiplicación de semillas.
Ventas y/o ingresos	No hay ítems asociados	No hay modificación a lo anterior	
Nacional			
Internacional			
Convenios comerciales	No hay ítems asociados	No hay modificación a lo anterior	

9.1.2. Impactos Sociales

Logro	*Al inicio del Proyecto*	*Al final del Proyecto*	*Diferencial*
Nivel de empleo anual	El sistema opera bajo la base de la interacción Empresa-CALT-SAG	No hay modificación a esta situación. Se trata de un sector altamente profesionalizado de la agricultura nacional.	
Nuevos empleos generados	No hay ítems asociados	- Se he generado un grupo de buen nivel técnico para evaluación en laboratorio y campo de flujo génico. Este mismo grupo se ha propuesto para el escalamiento de este trabajo a través de Innova. - SAG ha generado la necesidad de un laboratorio de biotecnología para análisis de este tipo de temas. Para esto se han generado nuevos cargos laborales.	Existe una expansión, a nivel técnico, del área de detección y análisis de transgénicos en el país. Se estima que el impacto sobre el sector agrícola vendrá de la adopción de la tecnología en presencia de un sistema regulador ágil y actualizado en el tema de co-existencia agrícola.
Productores o unidades de negocios replicadas	No hay ítems asociados	Se sabe la necesidad de centros técnicos para el análisis comercial, o servicio, de este tipo de material.	Se están generando las condiciones para avanzar en la generación de unidades de negocio relacionadas a la detección de OGMs y análisis de pureza genética en vegetales.

9.1.3. Impactos Tecnológicos

Logro	***Número***			***Detalle***
	Al inicio del Proyecto	***Al final del Proyecto***	***Diferencial***	
	No hay ítems relacionados	Incubadora con proyecto de interés público listo para entrar en funcionamiento	Grupo y experiencia en la detección de OGMs, unidad de servicios *ad portas*	Laboratorio de servicios para detección de OGMs y pureza genética asociado a ANPROS. Se ha planificado la instauración de un laboratorio de servicios para el sector productivo ligado a ANPROS (sector semillero) y también de servicio a terceros según impacto nacional (alimentos).
Producto	Catálogos botánicos impresos	Una base de datos de flujo génico y flora nacional.	El proyecto permitió la generación de la primera base de datos botánica y de modelamiento de flujo génico en el país.	Base de datos Botánica, Agronómica y de modelamiento para flujo génico entre cultivos convencionales y GM con especies nativas, introducidas y cultivadas en Chile. Base de datos actualizada desarrollada en función de los catálogos botánicos existentes y con sistemas de búsquedas y modelamiento de polinización cruzada entre especies y géneros.
Proceso	No hay ítems relacionados	No hay ítems relacionados		
	No hay servicios	No hay servicios formalmente	Grupo y experiencia en	Laboratorio de servicios para

Servicio	exitosos asociados	disponibles para los potenciales usuarios. Incubadora lista para entrar en funcionamiento	la detección de OGMs, unidad de servicios *ad portas*	detección de OGMs y pureza genética asociado a ANPROS. Cubrirá la necesidad del sector semillero en general y de otros sectores que se han visto impactados por la existencia de cultivos GM.

Propiedad Intelectual	***Número***	***Detalle***
Patentes		
Solicitudes de patente	1	Sistema de detección de híbridos inter-específicos del género *Brassica* sp. utilizando como marcador el gen receptor kinasa del sistema de autoincompatibilidad (*srk*). Solicitud CL3454-2005.
Secreto industrial	1	Primers y sistemas de detección evento específico para eventos GM de canola y maíz.
Resultado no patentable	Ver publicaciones	
Resultado interés público	2	- Base de datos para modelamiento de hibridación cruzada - Resultados de flujo génico en campos para maíz y canola.
Convenios comerciales		
Convenio o alianza tecnológica		
Generación de nuevos proyectos	1 Presentado a Innova Chile	Establecimiento de un sistema sustentable para la producción nacional de semillas, basado en la co-existencia agrícola de especies convencionales, genéticamente modificadas y orgánicas. INIA-ANPROS-U. de Chile.

9.1.4. Impactos Científicos

Logro	*Número*	*Detalle (citas, título, descripción)*
Publicaciones (Por ranking)	1 ISI en preparación	Interespecific hybridization in *Brassica* produces molecular rearrangements in the self-incompatibility receptor kinase gene (*srk*). Diez-de-Medina, S., Gaínza, F., De Felice, S., Acuña, M., Palma, E. and Prieto, H. (manuscrito terminado y en proceso de publicación ISI). Descripción del reordenamiento encontrado en el receptor de polen de los híbridos *Brassica rapa* x *Brassica napus* encontrados en campos de Chile. Este reordenamiento es de un carácter conservado y se encontró en todos los híbridos evaluados.
	1 Informe Nacional	Diagnóstico sobre la Presencia y Estado de la Flora chilena emparentada con Cultivos Genéticamente Modificados, con énfasis en el Riesgo de Flujo Génico, Carlos Muñoz Humberto Prieto, Pedro León, Erika Salazar, Fernando Reyes, Marcelo Rosas, Mélica Muñoz. Completo análisis y catastro de todas las especies nativas, introducidas y cultivadas presentes en Chile, con una detallada indexación de sus características agronómicas, botánicas y biológicas. Además, se incluyeron todas las especies transgénicas desarrolladas a la fecha (2004) en el mundo. El sistema generado permite realizar evaluaciones de flujo génico e indicar grados de riesgo de polinización cruzada, considerando todos las características descritas, en base a fórmulas matemáticas de modelamiento.
	2 Scielo En preparación	Evaluación de flujo génico en campos comerciales de maíz en la zona central de Chile Manuel Acuña, Erich Palma y Humberto Prieto. (manuscrito en preparación para publicación Scielo

		(Agricultura Técnica)). Trabajo específico que registra los resultados encontrado en campos GM maíz en el transcurso del proyecto. Se incluye abordaje técnico y resultados encontrados.
		Flujo génico entre cultivos genéticamente modificados y parientes silvestres Humberto Prieto. (manuscrito en preparación para publicación Scielo (Agricultura Técnica)). Revisión de tipo general sobre la experiencia desarrollada en el transcurso del proyecto, con énfasis en los resultados encontrados para los modelos estudiados, situaciones reales de campo y biología básica de estos sistemas.
Eventos de divulgación científica	Variados	Seminarios FIA. Presentaciones a Congresos científicos nacionales e internacionales (Argentina (REDBIO 2005 y México (V Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal de México). REDBIO: presentación básica de la ruta de trabajo para cada uno de los sistemas estudiados (canola, maíz y papa). México: presentación de la base de datos y sus resultados más relevantes.
Integración a redes de investigación	1	Lat-SOL Network (http://cnia.inta.gov.ar/lat-sol/). International and integrative research network of partner laboratories of Latin America working in *Solanacea* research.
	Otra	Grupo de Trabajo en especies nativas INIA_La Platina: *Solanum* spp. Banco de germoplasma, estrés abiótico y flujo génico (Integrado desde 2006 a Lat SOL).

9.1.5. Impactos en Formación

Logro	***Número***	***Detalle (Título, grado, lugar, institución)***
Tesis pregrado	6	- Sergio Diez de Medina, Bioquímico, U. de Chile. - Manuel Acuña Soto, Ing. Ej. Biotecnología, U. Vicente Pérez Rosales. - Felipe Gainza Cortés, Ing. Ej. Biotecnología, U. Vicente Pérez Rosales. - Soledad Cabrera Medina, Ing. Biotecnología, U. de Chile (en trámite). - Erich Palma Dóñez, Agrónomo, U. Mayor (en trámite). - Carolina Cortés Araya, Ing. Agrónomo, U. de Chile (en desarrollo).
Tesis postgrado		
Pasantías	múltiples	- Estadía en University of Reading, UK - Asistencia a GMCC´03 (Dinamarca) - Nexo INIA-UC Davis (Dr. Carlos Quiros)
Cursos de capacitación		

10. Discusión final, conclusiones y recomendaciones.

Desde 1991, Chile está desarrollando la capacidad de generar cultivos transgénicos con énfasis en la solución a problemas locales cuya solución sólo depende de nosotros. INIA - La Platina ha desarrollado cultivos de papa con resistencia a insectos y a la bacteria *Erwinia carotovora*, melones con resistencia a virus y vides con tolerancia mejorada para el hongo necrótrofo *Botrytis cinerea*. En la actualidad, este mismo centro se ha constituido en líder mundial de transformación genética de *Vitis vinifera* y desarrolla de forma acelerada nuevos prototipos en donde se modifica la síntesis de hormonas y también se introduce resistencia múltiple a virus. Otro mega-programa en este centro está destinado al desarrollo de plataformas reproducibles de transformación de frutales de carozo, con énfasis en el problema del daño por frío. La evaluación de este material es un paso obligado si se piensa en la introducción futura de estas nuevas variedades al mercado, donde la cuantificación del impacto de estos productos sobre nuestro ecosistema será fundamental para lograr la aceptación pública entre productores y consumidores.

Sin duda que este desarrollo nacional viene a coincidir con los requerimientos internacionales en cuanto a regulación del tránsito, manejo con identidad preservada y producción de los OGMs ya comercializados y eventualmente importados al país, encontrando a la fecha a los organismos fiscalizadores aún sin la capacidad técnica instalada de una forma efectiva para asegurar un correcto manejo de este material en nuestro país.

Desde el punto de vista de la producción de semillas, las grandes trans-nacionales utilizan predios de nuestro país en la multiplicación y evaluación de semillas GM para múltiples especies (Muñoz *et al.*, 2004). Todas estas evaluaciones cuentan con la aprobación del CALT y son constantemente fiscalizadas en terreno por el SAG, a través de sus distintas oficinas regionales, según correspondan a los ensayos agrícolas desarrollados. Esto implica que, la situación agrícola nacional derivada de estas circunstancias presenta ciertamente un escenario en donde están presentes, aunque en distinta significancia, la agricultura convencional, la orgánica y la transgénica. Es un hecho todavía más concreto y aún de manera independiente de lo anterior, el gran valor del producto "semilla" está basado en su calidad y pureza. La producción de semillas debe cumplir valores umbrales de contaminación, o de lo contrario, precisar valores exactos de mezclas adventicias. A pesar de ser esto cierto, no existen capacidades técnicas en el país para establecer y cuantificar qué tan puros son los productos que se desarrollan en nuestro mercado.

El flujo génico se refiere al movimiento, dispersión e incorporación de genes tanto dentro como entre individuos, poblaciones y *taxa*. En animales, esto básicamente puede ocurrir como resultado de inmigración o emigración de individuos de edad reproductiva en las poblaciones. En plantas, el flujo génico puede ocurrir vía polen, semillas o estructuras clonales, como bulbos y tubérculos. Cuando el flujo génico se da entre individuos de poblaciones que se diferencian en caracteres heredables, que pueden ser de la misma especie o de especies diferentes, el proceso se llama hibridación. Luego de ocurrido el evento de flujo génico, el gen recién llegado puede perderse en las siguientes generaciones, o eventualmente aumentar su número y persistir en el flujo evolutivo, este fenómeno de estabilización de un gen recién llegado (por flujo o mutación) se llama introgresión. Las especies cultivadas y por ende las transgénicas, pueden "cruzarse" con las especies

silvestres, por lo que se deben tomar los resguardos necesarios para evitar que nuestros recursos genéticos se contaminen con genes no deseados, especialmente si estos recursos tienen características que hagan recomendable su conservación en su estado más puro.

Para asegurar un nivel de protección adecuado de nuestros recursos genéticos, es necesario evaluar el riesgo que una eventual contaminación tendría para la biodiversidad. Este riesgo es inherente a la biología de cada especie transgénica y a la característica de su modificación y al estado de conservación de las especies silvestres. Por lo tanto, para la evaluación del riesgo debemos contar, entre otras cosas, con información adecuada y suficiente sobre las especies de plantas vasculares del país emparentadas con los cultivos convencionales y transgénicos. Para el caso de los transgénicos, es indispensable conocer tanto aquellos cultivos que están en producción comercial como aquellos que están en desarrollo en todo el mundo. Sólo un estudio detallado del riesgo que los cultivos transgénicos poseen para la biodiversidad, permitirá diseñar las medidas de manejo y control de este riesgo.

Sin embargo, el flujo génico entre plantas (cultivadas-cultivadas y cultivadas-silvestres) no ha sido un tema de preocupación de los científicos sino hasta ahora debido al creciente aumento, en los mercados, de variedades generadas a partir del uso de técnicas de ingeniería genética. Estas nuevas variedades, comúnmente llamadas transgénicas, han generado no sólo polémica desde el punto de vista del flujo génico, sino por las implicancias que su uso tiene desde el punto de vista ético, político, y social.

El flujo génico entre plantas cultivadas y silvestres emparentadas es mucho más común de lo pensado (Ellstrand *et al.*, 1999), y ocurre de acuerdo a mecanismos conocidos desde los inicios de la agricultura moderna; esto en un proceso de hibridación espontánea o, mucho más frecuente, en hibridación conducida por el hombre. Por lo tanto, el flujo génico desde una variedad transgénica a una planta silvestre ocurrirá de acuerdo a las mismas condiciones, mecanismos y procesos observados en el flujo génico desde cualquier planta cultivada a las especies silvestres emparentadas. Por esta razón se puede asumir que el flujo e introgresión de genes transgénicos en otras poblaciones (cultivadas y/o silvestres) es un hecho de ocurrencia probable. Se han publicado variados trabajos informando sobre flujo génico y factores que lo afectan en experimentos controlados para maíz (Jemison y Vayda, 2001; Ma, *et al.*, 2004; Stevens *et al.*, 2004; Halsey *et al.*, 2005), Brassica napus (canola, Kerlan *et al.*, 1993; JØrgensen *et al.*, 1998; Chevré *et al.*, 1996; Wilkinson *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2002), trigo (Gustafson *et al.*, 2005) y maravilla (Pilson *et al.*, 2002). En la misma línea, también se conoce de reportes que, no exentos de gran polémica, hablan de la posible introgresión en la naturaleza de transgenes desde cultivos GM, como ocurrió en el caso del teosinte en Oaxaca, México (Quist y Chapela, 2001; Ortiz-García *et al.*, 2005).

Chile ya posee indicadores de la preocupación y del impacto sobre la percepción pública que este desarrollo de la agricultura ha acarreado. El presente proyecto FIA, iniciado en 2001 claramente ha permitido cimentar bases técnicas para continuar con esta área de trabajo en el contexto de la co-existencia agrícola y la pureza genética de semillas. Este proyecto pionero ha generado las primeras informaciones sobre el impacto de los distintos tipos de semilleros diseñados y exigidos para maíz y canola. También en él se desarrollaron (y desarrollan) facetas experimentales para determinación de factibilidad de hibridación

entre distintas especies de *Solanum* (*tuberosum, maglia, stoloniferum, lugustrinum, albicans, chacoense y verrucosum*). Los resultados en canola han demostrado una baja tasa de hibridación interespecífica entre ésta y su pariente asilvestrada en Chile *Brassica rapa* (yuyo), con valores que estarían en el margen de menos del uno por cien en condiciones agrobioclimáticas de cosecha en los predios prospectados en las temporadas de producción (Informes Técnicos previos). De este modo, unas 63 plantas híbridas se encontraron en el transcurso de las 4 temporadas de prospecciones, en unos 15 predios cuarentenarios de canola GM. De la misma forma, en las prospecciones desarrolladas en maíz durante las temporadas pasadas, se detectaron tasas de hibridación bastante altas (5 a más del 20%), según la distancia entre predios y la zona agrobioclimática de ubicación de los campos semilleros prospectados. Aunque los valores encontrados en Chile para canola y maíz no representan un impacto ecológico considerable (debido al bajo valor en canola y a que las especies involucradas en maíz no son originarias de Chile), sí afectan el proceso de producción de semilla pura. Estos valores de hibridación sin duda también se deben registrar en los demás predios que incluyen a la agricultura convencional y orgánica, afectando de manera evidente la calidad del producto final.

Durante 2004, este mismo núcleo de investigación desarrolló un primer sistema de base de datos y modelamiento del impacto de los materiales transgénicos sobre la biodiversidad chilena. Como parte del proyecto "Desarrollo de un Marco Nacional de Bioseguridad", que fue coordinado por CONAMA y co-financiado por el GEF. En él se desarrolló una consultoría técnica en la que se recopiló, actualizó y sistematizó la información disponible acerca de la presencia, distribución, biología y estado de las especies nativas y silvestres presentes en Chile, que están emparentadas con los cultivos convencionales, incluidas las especies que tienen variedades transgénicas cultivadas o en desarrollo en el mundo y en Chile. Así, se desarrolló una categorización del eventual riesgo para cada especie, donde se consideraron factores como flujo génico reportado en el estado del arte (documentos específicos), viabilidad de polen, sistema reproductivo, fisiología, origen (nativo, endémico, introducido, naturalizado), ciclo de cultivo (anual o bianual, perenne) y otros. De esto, se generó bases de datos que contienen todas las especies cultivadas (222 especies), introducidas (más de 3500) y nativas (más de 5000) en Chile. De las 222 especies cultivadas en Chile, sólo 10 (un 4,5%), son nativas, mientras que las restantes 212, (el 95,5%), son introducidas. De las 212 especies cultivadas introducidas, sólo 52 (el 24,5%), tienen especies emparentadas en la flora vascular nativa de Chile. Un total de 62 especies cultivadas (nativas o introducidas), es decir el 27.9%, están emparentados con 824 especies nativas, esto es, un 16 % del total de la flora vascular nativa. De las restantes 160 especies cultivadas, el 72,1% del total, no tiene especies emparentadas a nivel de género en nuestra flora nativa. Con respecto a los transgénicos, de las 138 especies de cultivos transgénicos existentes a nivel mundial (cultivadas o en desarrollo), sólo 2 de ellas (*Solanum tuberosum* y *Paspalum dilatatum* Poir.) son especies nativas de Chile y un total de 24 especies de cultivos transgénicos están emparentadas a nivel de género con 236 especies nativas, esto es un 4,7 % de la flora nativa. Finalmente, este estudio logra establecer que en Chile, entre los años 2002 y 2004, se cultivan o han cultivado comercialmente 14 especies transgénicas en

8.230 hectáreas, las que se exportan en su totalidad, no estando autorizada su comercialización dentro del país.

Hacia fines de 2005, se presenta en la Oficina de Patentes del DPI de Chile, una solicitud de patente en la que se reclama el uso del gen del sistema de autoincompatibilidad sexual de canola, como un marcador preliminar para detectar híbridos del género Brassica encontrados en campo (Prieto *et al.*, 2005). Este desarrollo técnico permite en la actualidad, identificar rápidamente en el laboratorio, plantas que han sido producidas por hibridación derivada del polen de canola GM sobre plantas de *B. rapa* creciendo en los alrededores de los semilleros cuarentenarios de esta especie.

No existen en el mundo desarrollos alternativos superiores a los anteriormente expuestos, por lo que las estrategias diseñadas y las metodologías propuestas en este proyecto representan una aplicación actual de la forma en que la evaluación del impacto entre diversos cultivos sobre su producción y también de éstos sobre el medio ambiente es realizada.

Alternativamente, el núcleo ha logrado un continuo contacto con centros de investigación afines en Inglaterra (Mike Wilkinson, U. of Reading), EE.UU. (Carlos Quiros, U. California-Davis), México (Marilyn Warburton, CIMMYT) y Francia (Anne Marie Chèvre; INRA). Todos ellos realizan trabajos ligados al flujo génico (canola, U. Reading e INRA), a la aplicación de técnicas de marcadores moleculares para bancos de germoplasma (maíz, CIMMYT) y análisis de biodiversidad y al desarrollo de líneas sintéticas híbridas (canola, UC-Davis).

11. Bibliografía Consultada.

Charters, Y., Robertson, A., Wilkinson, M. y Ramsay, G. (1996). PCR analysis of oilseed rape cultivars (Brassica napus L. ssp. oleifera) using 5´-anchored simple sequence repeats (SSR) primers. Theor. Appl. Genetics **92**:442-447.

Chevré, A., Eber, F., Baranger, A., Kerlan, M., Barret, P., Festoc, G., Vallée, P. y Renard, M. (1996). Interspecific gene flow as a component of risk assessment for transgenic Brassicas. In: Proceeding International Symposium on Brassicas. Nith Crucifer Genetic Workshop. Dias JS, I Crute & AA Monteiro (Eds). Acta Horticulturae **407**: 196-179.

Ellstrand, N. y Hancock, J. (1999). Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. Annual Review Ecology and Systematic **30**: 539-563.

Gustafson, D., Horak, M., Rempel, C. y Hucl, P. (2005). An empirical model for pollen-mediated gene flow in wheat. Crop Science **45**:1286-1294.

Halsey, M., Remund, K., Davis, C., Qualls, M., Eppard, P. y Berberich, S. (2005). Isolation of maize from pollen-mediated gene flow by time ans distance. Crop Science **45**:2172-2185.

Jemison, J. y Vayda, M. (2001). Cross pollination from genetically engineered corn: wind transport and seed source. AgBioForum **4**: 87-92.

Jørgensen, R., Andersen, B. y Thure, P. (1998). Introgression of crop genes from oilseed rape (*Brassica napus*) to related wild species – An avenue for escape of engineered genes. In: Proceeding Symposium on Brassicas. Gregoire T & AA Monteiro (Eds). Acta Horticulturae **459**: 211-217.

Kerlan, M., Chevré, A. y Eber, F. (1993). Interspecific hybrids between a transgenic rapeseed (*Brassica napus*) and related species: cytogenetical characterization and detection of the transgene. Genome **36**:1099-1106.

Lodhi, M., Ye, G., Weeden, N. y Reisch, B. (1994). A simple and efficient meted for DNA extraction of grapevine cultivars and Vitis species. Plant Molecular Biology Reporter **12**:6-13.

Lu, C., Kato, M. y Kakihara, F. (2002). Destiny of a transgene escape from *Brassica napus* into *Brassica rapa*. Theor Appl Genet **105**:78-84.

Ma, B., Subedi, K. y Reid, L. (2004). Extent of cross-fertilization in maize by pollen from neighboring trasngenic hybrids. Crop Science **44**:1273-1282.

Matthei, O. (1995). "Manual de las malezas que crecen en Chile". Alfabeta Impresores, Santiago, Chile., 545 págs.

Muñoz, C., Prieto, H., León, P., Salazar, E., Reyes, F., Rosas, M. y Muñoz, M. (2004). Diagnóstico sobre la Presencia y Estado de la Flora chilena emparentada con Cultivos Genéticamente Modificados, con énfasis en el Riesgo de Flujo Génico. Informe Final Proyecto UNEP-GEF-CONAMA "Desarrollo de un Marco Nacional de Bioseguridad para Chile". CONAMA.

Nishio, T., Kusaba, M., Sakamoto, K. y Ockendon, M (1997). Polymorphism of the kinase domain of the S-locus receptor kinase gene (SRK) in Brassica oleracea L. Theoretical and Applied Genetics **95**:335-342.

Ortiz-García, S., Ezcurra, E., Schoel, B., Acevedo, F., Sobero, J. y Snow, A. (2005). Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico (2003–2004). Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **102**:12338-12343.

Pilson, D. Snow, A., Rieseberg, L. y Alexander, H. (2002). Fitness and population effects of gene flow from transgenic sunflower to wild Helianthus annuus. *In*: Proceeding of the Gene Flow Workshop: 58-65. The Ohio State University. http://www.biosci.ohio-state.edu/~lspencer/Proceedings.pdf.

Prieto, H., Salazar, E., Diez de Medina, S., Palma, E., Gaínza, F., Acuña, M. y Cabrera, S. (2005). Método de etección de híbridos inter-específicos de campo del género *Brassica* spp. utilizando como marcador el gen receptor kinasa del sistema de autoincompatibilidad (*srk*). Solicitud de Patente Chile Nº 3454-2005

Quist, D. y Chapela, H. (2001). Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. Nature **414**:541-543.

Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989). En "Molecular cloning: a laboratory manual". Nolan, C. (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2ª Ed.

Tozzini,A., Martinez, M., Lucca,C., Vázquez, A., Distefano, M., del Vas, H. y Hopp., E. (2000). Semi-quantitative detection of living modified organisms (LMOs) in grains. E. J. B. **3**:1-5.

Wilkinson, M., Davenport, I., Charters, Y. y Jones, A., Allainguillaume, J., Butler, H., Mason, C. y Raybuld, F. (2000). A direct regional scale estimate of transgene movement from genetically modified oilseed rape to its wild progenitors. Mol. Ecol. **9**:983-991.

Zhang,Y., Uyemoto, J. y Kirpatrick, B. (1998). A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogenes for PCR assay. J. Virol. Method. **71**:45-50.

12. Anexos.