

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



EVALUACIÓN DE PROMOTORES POLEN-ESPECÍFICOS DE
Arabidopsis thaliana **EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE**
Brassica napus.

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

NATALIA FERNANDA AGUILERA RODRÍGUEZ

TEMUCO – CHILE
2013

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



EVALUACIÓN DE PROMOTORES POLEN-ESPECÍFICOS DE
Arabidopsis thaliana **EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE**
Brassica napus.

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

NATALIA FERNANDA AGUILERA RODRÍGUEZ

PROFESOR GUÍA: Dra. MARÍA LAURA FEDERICO

TEMUCO – CHILE
2013

“EVALUACIÓN DE PROMOTORES POLEN-ESPECÍFICOS
DE *Arabidopsis thaliana* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE
Brassica napus”

PROFESOR GUÍA

: _____

Dra. María Laura
Federico

Investigadora del Centro de
Genómica Nutricional
Agroacuícola (CGNA)

PROFESOR CONSEJERO

: _____

Dr. León A. Bravo

Profesor asociado
Universidad de
La Frontera.

CALIFICACIÓN PROMEDIO TESIS

: _____

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	<i>Brassica napus</i> : Importancia agronómica	3
2.2	Ingeniería genética y biotecnología vegetal	4
2.3	Promotores tejido-específicos: su importancia en estrategias biotecnológicas de mejoramiento	5
2.4	Desarrollo de la flor de <i>B. napus</i>	7
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1	Construcción de vectores de expresión	11
3.1.1	Desfosforilación de extremos 5' romos.....	11
3.1.2	Ligación.....	12
3.2	Transformación de <i>E. coli</i>	13
3.3	Purificación de DNA plasmidial a partir de cultivos bacterianos	13
3.4	Digestión de ADN plasmidial con enzimas de restricción.....	14
3.5	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404.....	14
3.6	Transformación de <i>B. napus</i> con <i>A. tumefaciens</i>	15
3.7	Evaluación de plantas transgénicas	18
4.	RESULTADOS	21
4.1	Construcción de vectores de expresión pCAMBIA::PSG2 y pCAMBIA::PSG4	21
4.2	Transformación genética y evaluación de brotes regenerados.	22
4.3	Evaluación de la especificidad de expresión dirigida por el promotor PSG2.	23
5.	DISCUSIÓN.....	26
6.	CONCLUSIONES.....	29
7.	REFERENCIAS	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Relación evolutiva entre <i>Arabidopsis thaliana</i> y Brassica.	4
Figura 2 Estructura de la flor.....	7
Figura 3 Estadios de desarrollo floral en <i>B. napus</i>	9
Figura 4 Proceso de construcción de vectores pCAMBIA::PSG2 y pCAMBIA::PSG4.....	12
Figura 5 Proceso de transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
Figura 6 Vectores de expresión utilizados en el estudio.	21
Figura 7 Evaluación de evento de transformación	23
Figura 8 Análisis de expresión dirigida por proPSG2.....	24
Figura 9 Análisis histoquímico de evento transgénico pCAMBIA::PSG2	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Oligonucleótidos	19
Tabla 2 Resumen de trabajo de transformación	22

RESUMEN

Los promotores constitutivos son ampliamente utilizados en ingeniería genética para la expresión de genes en todos los tejidos de la planta. Sin embargo, en algunos casos no se requiere la expresión constitutiva de proteínas foráneas en plantas transgénicas siendo beneficioso utilizar promotores que sólo expresan el transgén en tejidos u órganos vegetales específicos.

Los promotores tejido-específicos tienen el potencial de otorgar expresión génica dirigida a sólo aquellas partes de la planta en las cuales se requiere la acumulación de una proteína transgénica (por ejemplo: hojas, raíces, semillas, etc.). A la fecha, un número de promotores tejido-específico han sido utilizados en la producción de plantas transgénicas estériles, resistentes a patógenos y a estrés abiótico.

En *Arabidopsis thaliana* existen promotores que controlan la expresión de un grupo de cinco genes llamados POLLEN-SPECIFIC GENES (PSG 1-5). El promotor del gen PSG2 (proPSG2) es fuerte mientras que el promotor del gen PSG4 (proPSG4) es débil, pero ambos regulan la expresión exclusivamente en polen. Sin embargo, es necesario evaluar si estos promotores se comportan de la misma manera en especies de importancia agronómica como *Brassica napus* para luego utilizarlos en estrategias biotecnológicas. La relación evolutiva existente entre *A. thaliana* y *B. napus* permite suponer que la especificidad de tejido observada en *Arabidopsis* se conservará en *Brassica*.

Para investigar el patrón de expresión de los promotores PSG2 y PSG4 en *B. napus*, un fragmento funcional en *A. thaliana* de cada promotor fue fusionado con los genes reporteros que codifican para la enzima β -glucuronidasa (GUS) y la proteína verde fluorescente (GFP) en el vector pCAMBIA 2300. Las construcciones generadas se utilizaron para realizar transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Una vez obtenidas las plantas transgénicas, se evaluó la expresión del gen GUS en distintos estadios de desarrollo

floral (polen y anteras), en hojas, tallo y raíz utilizando RT-PCR y análisis histoquímico (tinción GUS).

Luego de analizar un evento transgénico generado, se concluye que la especificidad de expresión dirigida por proPSG2 es retenida en *B. napus*, ya que al igual que en *A. thaliana* se observó tinción positiva de los granos de polen y no de tejidos esporofíticos. Además se observó acumulación preferencial de transcritos del gen reportero en anteras utilizando RT-PCR.

SUMMARY

Constitutive promoters are widely used in genetic engineering for the expression of genes in all plant tissues. The constitutive expression of a foreign protein in transgenic plants, however may not be required and the use of promoters that express the transgene only in specific plant tissues or organs might be beneficial.

Tissue-specific promoters have the potential to deliver genic expression to only those parts of the plant in which the accumulation of a transgenic protein is required (eg. leaves, roots, seeds, etc.). To date, a number of tissue-specific promoters have been used in the production of sterile transgenic plants and to increase the resistance to pathogens and to abiotic stress.

In *Arabidopsis thaliana*, a group of genes called POLLEN-SPECIFIC GENES (PSG 1-5) bear promoters capable of controlling pollen-specific expression. The PSG2 gene promoter (proPSG2) is strong, while PSG4 gene promoter (proPSG4) is weak, but both regulate the expression exclusively in pollen. In order to use these promoters in biotechnological strategies, it is necessary to evaluate whether they retain their tissue-specificity in agronomically important species such as *Brassica napus*. Due to the evolutionary relationship between *A. thaliana* and *B. napus* it is expected that tissue-specificity observed in *Arabidopsis* will be retained in *Brassica*.

To investigate the expression pattern of proPSG2 and proPSG4 in *B. napus*, an *A. thaliana* functional fragment of each promoter was fused with a reporter gene (GUS) in the pCAMBIA 2300 vector. The generated constructions were used in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. After obtaining transgenic plants, expression of the reporter gene was evaluated in different flower developmental stages (anthers and pollen), in leaves, shoot and roots using RT-PCR and histochemical analysis (GUS staining).

After evaluating one transgenic event, we can infer that pollen-specificity is retained in *B. napus*, since positive GUS staining was observed in pollen grains and not in other sporofytic tissues like in *A. thaliana*. In addition, reporter gene transcripts were preferentially accumulated in anthers by RT-PCR.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se han destinado recursos y se han hecho considerables esfuerzos en mejorar genéticamente una serie de especies vegetales con el fin de aumentar la productividad de los cultivos. Un incremento en la productividad se ve asociado a mayores rendimientos, menor aplicación de pesticidas y fertilizantes, menor demanda de técnicas de producción, mejor calidad de los productos generados, utilización de técnicas de procesamiento más simples o mejores tecnologías de monitoreo y almacenamiento. La biotecnología ha formado parte importante en la búsqueda e investigación de estrategias para que los cultivos posean características atractivas, compatibles con un aumento en su producción

Los Organismos Genéticamente Modificados (OGM) son organismos cuyo material genético ha sido alterado por la inserción de una o varias secuencias de ADN provenientes de otro organismo. Con los rápidos avances acontecidos en la biotecnología, se han generado un número importante de OGM o transgénicos con características de interés agronómico, entre los que se encuentra algodón, maíz y canola resistentes a plagas y soja resistente a herbicidas. Ya en el año 2010 había una superficie aproximada de 70 millones de hectáreas sembradas con cultivos transgénicos, y se espera que esta cifra aumente, especialmente debido a que países en vías de desarrollo se han sumado a la siembra de superficie con este tipo de cultivos.

En el proceso de obtención de un organismo transgénico es necesario, en primer lugar, identificar un carácter deseable en un organismo (organismo donante). Luego se debe determinar el gen responsable de dicho carácter, aislarlo y caracterizarlo. El gen de interés debe ser fusionado con otros elementos para que éste sea funcional en el organismo receptor y así ser transferido al mismo. Una vez realizada la transferencia e identificado el organismo transformado, se debe crecer y reproducir para continuar la evaluación del gen de

interés en las sucesivas generaciones. Entre los elementos que deben acompañar al gen que se desea transferir para asegurar su expresión en el organismo blanco, probablemente el más importante a nivel de regulación, es el promotor. Los promotores consisten, en general, en la región de la secuencia genómica río arriba del sitio de inicio de la transcripción de un gen. Son capaces de controlar el grado, dónde y en qué momento un gen es expresado y pueden ser fuertes, con un alto índice de transcripción, o débiles con una transcripción más reducida.

Las especies modelo, como *Arabidopsis thaliana*, son una herramienta fundamental para estudiar determinados caracteres. Los resultados pueden ser extrapolados a otras especies que no estén caracterizadas totalmente, y se podría esperar que el comportamiento observado en el organismo modelo se retenga en la especie de interés, si es que existe cierto grado de similitud entre los organismos estudiados. La identificación y aislamiento de secuencias con un comportamiento deseado en un organismo modelo sientan la base para suponer que estas funcionarán de igual manera en otras especies, y por lo tanto puedan ser utilizadas en la transformación genética de cultivos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Brassica napus*: Importancia agronómica

La tribu Brassiceae es una de las tribus con mayor variabilidad morfológica dentro de la familia Brassicaceae. Es un grupo monofilético (Lysak *et al*, 2005) que comprende más de 40 géneros (USDA, 2014) y que incluye importantes cultivos de Brassica. El género Brassica está compuesto por 380 especies (The Plant List, 2010), entre las que se encuentran especies de relevancia económica por ser la fuente de aceite vegetal más grande después de la soja, con una producción mundial que alcanzó los 67 millones de toneladas el año 2013 (FAO, 2013) y se pronostica alcanzará los 68 millones para el año 2014. En la actualidad, 40.883 hectáreas se encuentran sembradas en Chile (INE, 2013). Cabe destacar además que en el período 2012-2013 se alcanzó una producción de 155.877 toneladas (ODEPA, 2013). Entre dichas especies se encuentra *Brassica napus* que corresponde al cultivo de mayor importancia en el hemisferio Norte, destacando Canadá y Europa. Los cultivos de *Brassica* de semillas oleaginosas ocupan un lugar importante en la industria alimentaria, pero además son una fuente potencial para la generación de combustibles renovables y de materia prima para la industria química.

B. napus es una especie que se originó por la hibridación interespecífica entre los genomas diploides de *B. rapa* (genoma A) y *B. oleracea* (genoma C) (Parkin *et al*, 1995; U 1935). Los subgenomas de Brassica están relacionados al de *Arabidopsis thaliana* (Parkin *et al*. 2005) (Figura 1), con alta similitud en su secuencia nucleotídica (Cárdenas *et al*, 2012). Se ha establecido además que no han ocurrido rearrreglos cromosómicos mayores después de la fusión de los genomas progenitores A y C. La similitud entre estas especies permite realizar estudios

genómicos comparativos e implica que el comportamiento de un gen es similar en ambas especies.

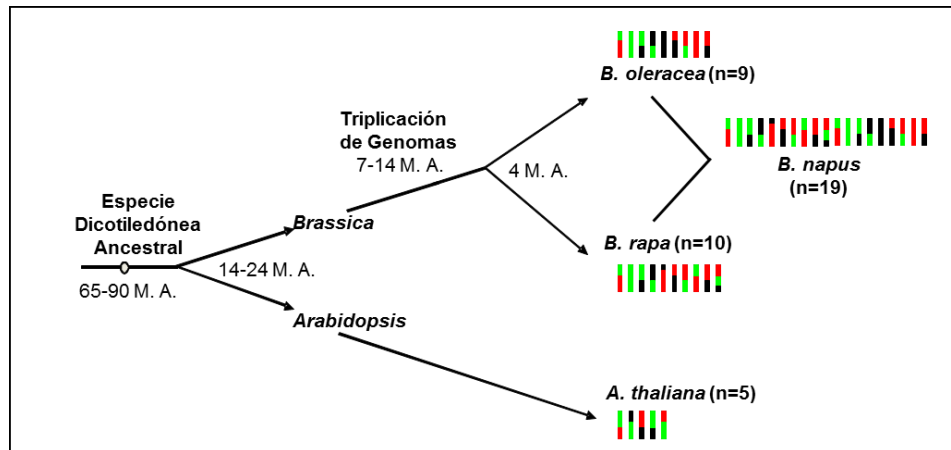


Figura 1 Relación evolutiva entre *Arabidopsis thaliana* y Brassica.

2.2 Ingeniería genética y biotecnología vegetal

Desde sus comienzos, el objetivo del mejoramiento vegetal ha sido seleccionar genotipos superiores a partir de la identificación de fenotipos superiores, sin embargo, se requieren años para obtener una variedad con valor agregado. Debido a la amplia gama de usos que se le da al raps, la biotecnología se ha enfocado en mejorar ciertos atributos, transfiriéndole características, como por ejemplo resistencia a herbicidas (Husken & Dietz- Pfeilstetter, 2007; Beckie *et al*, 2003) virus (Walsh *et al*, 1999), hongos (Wang *et al*, 1999) e insectos (Wang *et al*, 2005) se ha modificado la composición de aceites en las semillas (Dehesh *et al*, 1996; Knutzon *et al*, 1992), y la fertilidad masculina (Beltrán *et al*, 2007).

Para transferir características de un individuo a otro es necesario evaluar cómo actúan los genes en una especie para ayudar a perfeccionar otra. Las dos estrategias más utilizadas para obtener plantas transformadas y estables son la biobalística, en la que se bombardea la célula huésped con microproyectiles recubiertos en ADN, o transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Davey *et al.*, 1989; Gelvin, 2003), en donde la secuencia genética de interés es integrada en el genoma de la planta huésped haciendo uso de la capacidad natural de la bacteria para transferir ADN a otras células. Cuando es posible, se prefiere la infección utilizando *Agrobacterium*, ya que las plantas transgénicas generadas mediante esta técnica son menos propensas a sufrir silenciamiento (De Wilde *et al.*, 2000).

2.3 Promotores tejido-específicos: su importancia en estrategias biotecnológicas de mejoramiento

Dependiendo de la característica que se desea transferir y de la especie vegetal utilizada, se pueden producir proteínas foráneas en varios tipos de tejidos vegetales. En estudios con plantas transformadas, es común que se utilicen promotores constitutivos que expresen un determinado gen en todos los tejidos de un organismo. En ciertos casos, sin embargo, la expresión constitutiva de un gen no es necesaria, especialmente cuando su expresión en un lugar determinado es suficiente para obtener los resultados esperados. La elección del promotor para la expresión genética en plantas es un factor esencial ya que determina el tejido, el momento y en qué grado se produce una proteína recombinante dentro de la planta. (Maizel & Weigel, 2004). Además, el tipo de tejido elegido para la acumulación de una determinada proteína puede afectar notablemente los costos de producción de la misma (Kusnadi *et al.*, 1997; Horn *et al.*, 2004), en aquellos casos donde las plantas son utilizadas como bioreactores.

Los promotores tejido-específicos tienen el potencial de aumentar la estabilidad de una proteína recombinante, y de expresar un gen solamente en partes específicas del organismo. Muñoz y colaboradores identificaron promotores que regulan la actividad de un grupo de genes llamados POLLEN SPECIFIC GENES 1-5 (PSG1-5). Ello se logró, en primer lugar, identificando en la base de datos de microarreglos secuencias que sólo se expresaran en polen o tejidos que lo contengan, que se expresen en polen maduro y que además, se encuentren en una alta proporción al compararlos con otros tejidos esporofíticos. Con la finalidad de determinar la regulación espacio-temporal que ejercen los promotores de estos genes en un contexto independiente del ORF, se realizó una fusión transcripcional de las regiones río arriba de los genes PSG con el gen reportero β -glucuronidasa (GUS) y proteína verde fluorescente (GFP) y se transformaron plantas de *A. thaliana* de manera estable. Se logró determinar de esta manera que el gen reportero sólo se expresaba en flores y polen de *A. thaliana*. Se descubrió que los promotores de los genes PSG2, PSG4 y PSG5 presentan actividad exclusivamente en polen y que proPSG1 y proPSG2 son promotores fuertes, mientras que proPSG4 y proPSG5 son promotores débiles. La identificación de secuencias promotoras altamente específicas para el polen podría permitir generar un sistema de expresión finamente regulado con el fin de generar, por ejemplo, plantas incapaces de producir polen (macho-estéril), con resistencia a enfermedades, a plagas, etc.

Una estrategia para la generación de plantas macho-estériles corresponde a la ablación genética, método que se refiere a la extirpación de un tejido o célula específica mediante la expresión de un gen citotóxico (Beltrán *et al*, 2007). Para ello es necesario que el gen esté bajo el control de un promotor finamente regulado (Thorsness *et al.*, 1993). Por otra parte, se ha estudiado la posibilidad de generar plantas resistentes a distintas plagas, pues los daños más importantes ocurren durante el establecimiento y desde la floración hasta la madurez de la planta (Miles & McDonald 1999). Por ejemplo la abeja del polen (*Meligethes* spp.) afecta a cultivos en Europa (Slater *et al*, 2010), y *Phyllotreta cruciferae* y *P. striolata* que son las plagas que causan mayores pérdidas económicas en los cultivos de canola de Canadá (Burgess, 1997; Lamb, 1989) podrían verse disminuidas si es que la planta produjera toxinas en aquellos tejidos que sirven de alimento a los insectos (ej. polen).

2.4 Desarrollo de la flor de *B. napus*

La flor es la parte de la planta con mayor complejidad morfológica, pues está compuesta de distintos órganos dispuestos en una forma determinada (Figura 2). Entre dichos órganos se encuentran los estambres y el carpelo que corresponden a las estructuras masculinas y femeninas, respectivamente. La flor de *B. napus*, o canola, es bisexual tiene 4 sépalos, 4 pétalos y 6 estambres, 2 de los cuales son más cortos que el resto. El estambre está compuesto por la antera, que es el lugar donde ocurre el desarrollo del polen y por el filamento que transporta agua y nutrientes a la antera y le da soporte para dirigir la dispersión del polen (Scott *et al*, 2004).

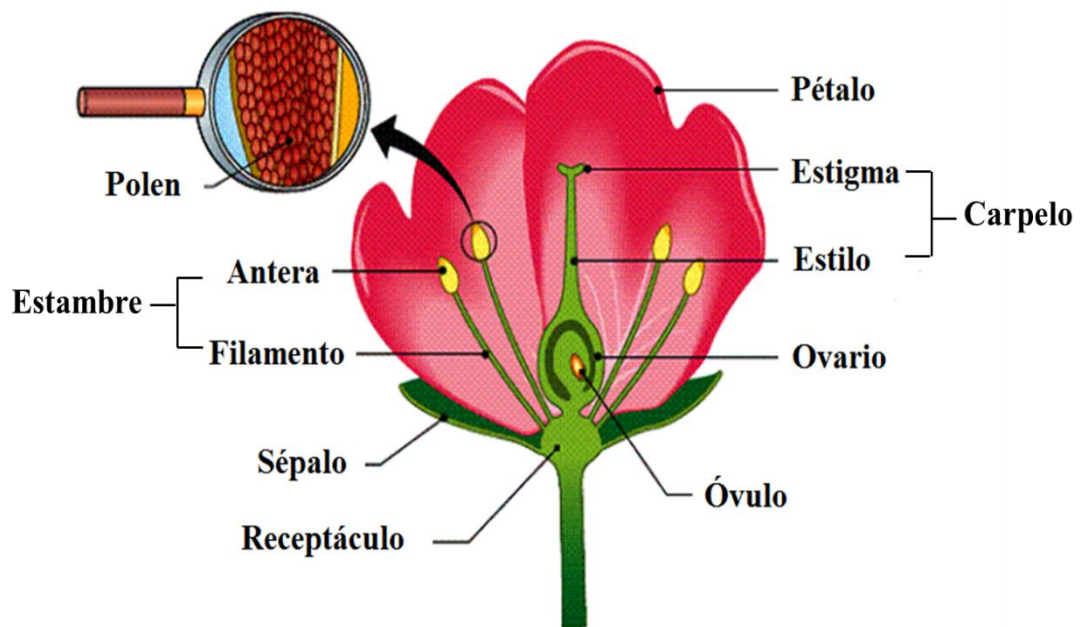


Figura 2 Estructura de la flor

La antera está formada por 2 tecas, cada una compuesta por 4 esporangios que contienen al saco polínico o lóculo. En los estadios de desarrollo más tempranos, los 4 esporangios no están completamente separados y aún son de color verde (Figura 3, A1). Dentro del lóculo se encuentran los microesporocitos que sufren procesos de mitosis, meiosis y reorganizaciones citoplasmáticas para generar granos de polen maduros que son liberados una vez que la flor se abre y ocurre la dehiscencia de las anteras (Figura 3, A4). Los filamentos continúan extendiéndose hasta que sobrepasan al estigma (Figura 3, A5).

La fertilización del óvulo en canola ocurre usualmente por auto polinización ya que cada flor produce la cantidad suficiente de polen como para desplazar al polen proveniente de flores adyacentes. Sin embargo, también puede ocurrir entrecruzamiento entre plantas vecinas en una tasa aproximada del 30% (Husken & Dietz-Pfeilstetter, 2007). Esto se debe a que los granos de polen son relativamente grandes (32 – 33 μm) y pegajosos (Treu & Emberlin, 2000), facilitando la autopolinización pero al mismo tiempo existiendo la posibilidad de que puedan ser trasladados por el viento y/o insectos.

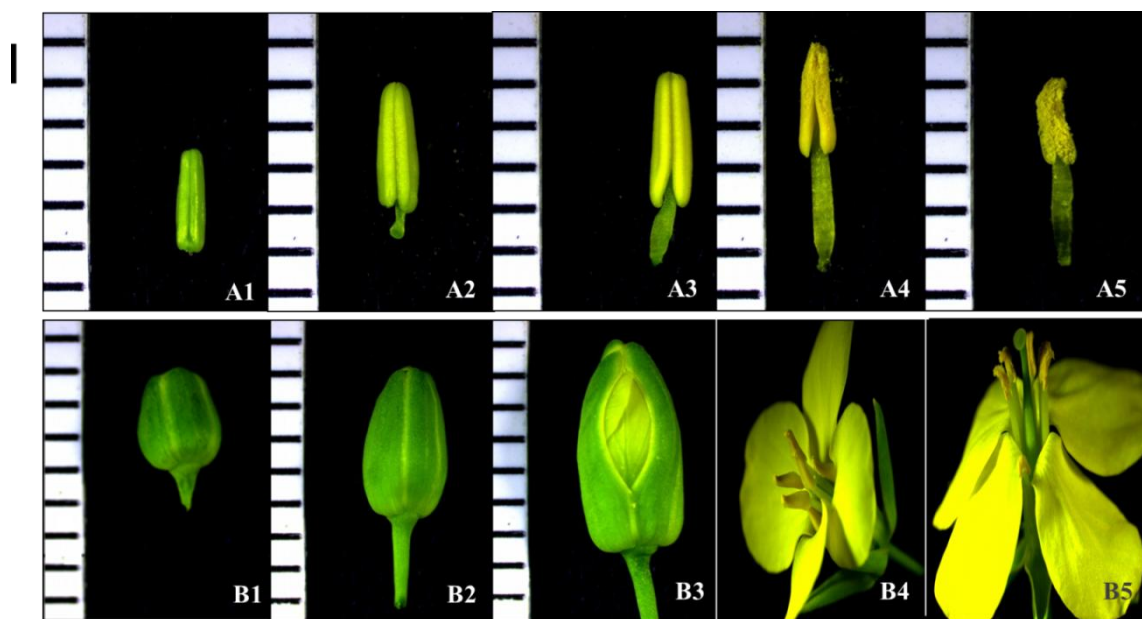


Figura 3 Estadios de desarrollo floral en *B. napus*. A1 – A5 Estadios antera 1 – 5; B1 – B5 Estadios flor 1 – 5.

— 1 mm

3.1 Hipótesis

Los promotores polen-específicos de *Arabidopsis thaliana* retienen su especificidad en plantas transgénicas de *Brassica napus*.

3.2 Objetivo General

Evaluar el funcionamiento de los promotores polen-específicos de *Arabidopsis thaliana* en plantas transgénicas de *Brassica napus*.

3.3 Objetivos específicos

1. Generar plantas transgénicas de *B. napus* que expresen el gen reportero GUS regulado por los promotores polen-específico proPSG2 y proPSG4.
2. Evaluar la expresión del gen reportero en plantas transgénicas de *B. napus* en diversos eventos generados para ambos promotores polen-específicos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Construcción de vectores de expresión

La liberación de cada promotor y de los genes GFP y GUS desde el plásmido pKGFWFS7 se realizó utilizando las endonucleasas *SmaI* y *ScaI* a partir de 10 µg de DNA y utilizando 15 U de enzima por reacción, a 30°C y 37 °C, respectivamente durante 16 horas siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalizada cada digestión, se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TBE 0.5% para separar el fragmento de interés. Posteriormente, el fragmento fue purificado utilizando el Kit de extracción de gel E.Z.N.A. (Omega Biotek, GA, USA). En paralelo se liberó un fragmento previamente insertado en el vector pCAMBIA2300 utilizando la endonucleasa *XbaI*. El plásmido fue religado y posteriormente se linealizó utilizando la endonucleasa *SmaI*.

3.1.1 Desfosforilación de extremos 5' romos. Se preparó una reacción con ADN equivalente a 0,5 pmol de extremos 5' ($\text{pmol extremos } 5' = (\text{ug ADN/tamaño ADN kb}) * 3,04$), 0,01 U/ul de CIAP y buffer CIAP 10X en un volumen de 50 ul siguiendo las recomendaciones del fabricante (Promega, USA). La reacción se incubó por 15 minutos a 37°C, luego a 56°C por 15 minutos. Se agregó una alícuota de CIAP equivalente al utilizado previamente y se repitieron ambas incubaciones a 37°C y 56°C por 15 minutos cada una. La reacción se detuvo agregando 2 ul de EDTA 0,5M e incubando a 65°C por 20 minutos. El plásmido linearizado fue purificado (OMEGA Bio-tek, GA, USA).

3.1.2 Ligación. La reacción de ligación se realizó incubando el fragmento con el vector en una razón molar 3:1, utilizando 150 ng de vector durante 16 horas a 22°C en buffer de ligación 10X, con 1 unidad de la enzima T4 ADN ligasa, en un volumen final de 10 µl. Para inactivar la ligasa, se incubó a 65°C por 10 minutos.

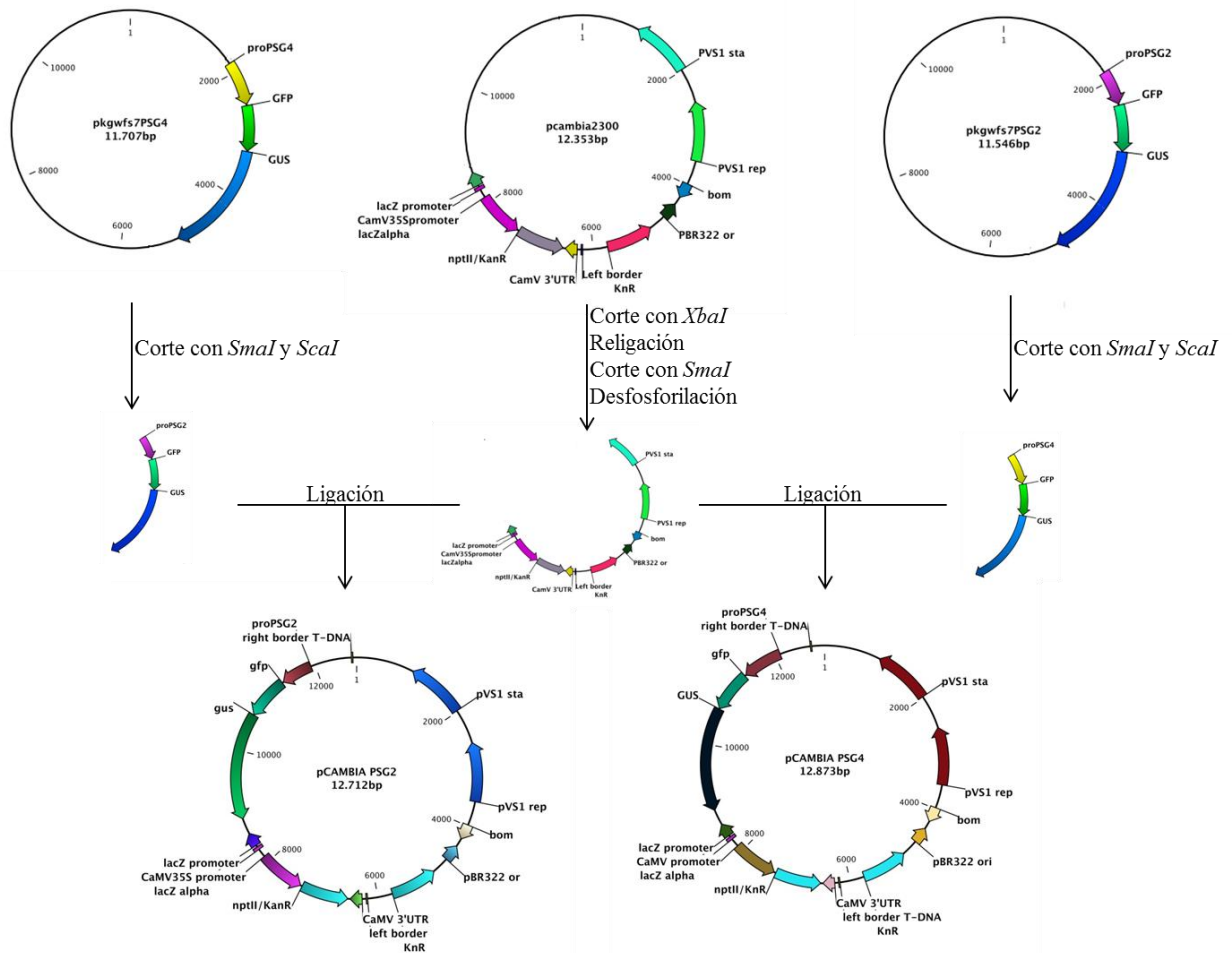


Figura 4 Proceso de construcción de vectores pCAMBIA::PSG2 y pCAMBIA::PSG4.

3.2 Transformación de *E. coli*

Se mezclaron 50 μ l de células de la cepa comercial de *Escherichia coli* JM109 quimiocompetentes con 3 μ l de cada ligación. Se incubó por 30 minutos en hielo y se le dió un shock térmico por 35 segundos a 42°C. Las células se resuspendieron en 400 μ l de medio SOC (bacto triptona 2% [m/v]; extracto de levadura 0,5% [m/v]; NaCl 1M; KCl 1M; glucosa 2M; stock Mg^{2+} 2M (1M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1M $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$)) y se dejó en agitación a 37°C por 1 hora para luego sembrar en placas Petri con medio LB suplementado con x-gal (0,1 mg/ml) y kanamicina (50 μ g/ml). Las placas se dejaron a 22°C por 16 horas.

3.3 Purificación de DNA plasmidial a partir de cultivos bacterianos

Se picaron 20 colonias de cada placa y se crecieron a 37 °C en 5 ml de medio LB líquido en presencia de los antibióticos correspondientes con agitación constante. Para la extracción de ADN plasmidial se empleó el método de lisis alcalina. Brevemente, 1,5 ml de cultivo bacteriano se centrifugan por 30 segundos a 13.000 rpm a 4°C. Se removió el medio para dejar el sedimento lo más seco posible y luego el pellet se resuspendió en 100 μ l de solución I (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0; glucosa 50mM). Luego se agregó 200 μ l de solución II (NaOH 0,2 M, SDS 1% [m/v]), se mezcló por inversión y continuó trabajando en hielo. Posteriormente se agregó 150 μ l de solución III (acetato de potasio 5 M; ácido acético glacial 5M), se mezcló por inversión, se incubó por 5 minutos en hielo y se centrifugó por 5 minutos a 13.000 rpm a 4°C. Se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregó 900 μ l de etanol 100% (v/v). Se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 2 minutos y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el DNA se lavó con 1 ml de etanol 70% (v/v) y se mezcló para luego centrifugar por 2 minutos a

13.000 rpm a 4°C. Se eliminó nuevamente el sobrenadante, se secó hasta que el etanol se evaporó completamente y el sedimento se resuspendió en 50 µl de buffer TE (pH 8.0) con 20 µg/ml de RNasa A (10 mg/ml).

3.4 Digestión de ADN plasmidial con enzimas de restricción.

Los análisis de restricción se realizaron con las enzimas *EcoRI* para verificar la presencia o ausencia del inserto en las ligaciones. El patrón esperado para pCAMBIA::PSG2 era de 3985 y 8727 pb y para pCAMBIA::PSG4 era de 4146 y 8727 pb. Para chequear la dirección en que se fusionó el inserto se realizaron digestiones con las enzimas *AscI*, *PsiI* y *NcoI* para pCAMBIA::PSG2 y las enzimas *AscI*, *HindIII* y *BamHI* para pCAMBIA::PSG4. El patrón de bandas esperado en el caso de pCAMBIA::PSG2 para *AscI* era 1078 y 11634 pb, para *PsiI* 5531 y 7181 pb y para *NcoI* 1403 y 11309 pb. En pCAMBIA::PSG4 se esperó que *AscI* generara un patrón de bandas de 1108 y 11769 pb, y para la digestión doble con *HindIII* y *BamHI* se esperaba un fragmento de 375 y otro de 12512 pb. Para las reacciones de digestión se utilizó 0,5 – 1 µg de DNA y 5 – 20 U de enzima por reacción, a 37 °C durante 1 – 4 horas, siguiendo las recomendaciones del fabricante (New England Biolabs, MA, USA).

3.5 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404.

Se mezcló 50 ng de ADN plasmidial con 20 µl de células electrocompetentes y se electroporó a 2.5 kV, 129 Ω y 50 µF (Electro cell manipulator 600, BTX, USA) utilizando una

cubeta de electroporación (2mm gap long, Cell Projects, Reino Unido). Inmediatamente se resuspendieron las células en 1 ml de medio YM, incubándose a 30°C con agitación (225 rpm) por 3 horas. Posteriormente, se sembraron 100 ul de cada cultivo en placas Petri con medio LB suplementado con Streptomicina (50 ug/ml), Rifampicina (50 ug/ml) y Kanamicina (100 ug/ml). Las placas fueron incubadas a 30°C por 48 horas.

3.6 Transformación de *B. napus* con *A. tumefaciens*.

3.6.1 Generación de explantes. Semillas de *B. napus* variedad Westar se esterilizaron lavando las semillas con 35 mL de una solución 95% (v/v) de etanol durante 2 minutos con agitación. Se eliminó la solución de etanol y se lavaron con 35 mL de hipoclorito de sodio 15% (v/v) por 20 minutos en agitación. En una campana de flujo laminar se eliminó la solución de hipoclorito de sodio y se lavó 3 veces con 35 mL de agua estéril por 10 minutos cada vez. A continuación se eliminó el agua y las semillas se sembraron en placas de Petri con medio de Germinación (MSMS 0,22% [m/v]; sucrosa 1%; pH 5.8) (Phyto Technology Laboratories, KS, USA) sólido y se ubicaron en una cámara de crecimiento con temperatura controlada de 22 - 23 °C y un fotoperíodo controlado de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante cinco días (Figura 5.A).

3.6.2 Cultivo de *A. tumefaciens*. Se inocularon 10 ml de medio LB líquido suplementado con Kanamicina (50 ug/ml) y Streptomicina (100 ug/ml) con 10 ul del stock de glicerol de *A. tumefaciens* transformada con una de las construcciones. El cultivo se dejó a 30°C en agitación por 2 días hasta que la O.D₆₀₀ alcanzara entre 1-1.8 unidades de absorbancia.

3.6.3 Inoculación. Se cortaron todos los cotiledones (300-500 por día de transformación) y se sumergieron durante 15 minutos a temperatura ambiente en 1 ml del cultivo de *Agrobacterium*

(Figura 5.B) suspendido en medio de cocultivo (medio MS 0,4% [m/v]; sucrosa 2% [m/v]; 2,4-D 0,5 [ng/ml]; MES 0.05 % [m/v]; acetosyringona [0,04 % m/v]; DMSO 1 % [v/v]). El cocultivo de cotiledones y *Agrobacterium* se realizó en seco a 15°C por 5 días (Figura 5.C).

3.6.4 Selección / Regeneración. Posterior al cocultivo, los cotiledones se traspasaron a medio de Selección/Regeneración (MSMO 0,44% [m/v]; sucrosa 3% [m/v]; BAP 4,5 mg/L; pH 5.8) (Figura 5.D) suplementado con kanamicina (25 mg/L) para seleccionar transformantes. Las placas se guardaron en cámara de crecimiento con intensidad lumínica de 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ durante las primeras dos semanas y luego 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ por el período restante.

Los callos (Figura 5.E) se traspasaron a medio fresco cada dos semanas. Cuando se generaron brotes (Figura 5.F), se traspasaron a medio de Elongación de Brote (MSMO 0,44% [m/v]; sucrosa 3% [m/v]; BAP 0,5 mg/L pH 5.8) (Figura 5.G). Una vez que los brotes eran suficientemente grandes, se traspasaron a cajas Magentas con medio de Enraizamiento (MSMS 0,44% [m/v]; sucrosa 3% [m/v]; NAA (0,1 mg/L); pH 5.8) (Figura 5.H) para obtener raíces y eventualmente pasar a tierra y trasladar a invernadero. Una vez que las plantas alcanzaron un tamaño adecuado (Figura 5.I), se colectaron 100 mg de hoja verde de cada brote para su evaluación.

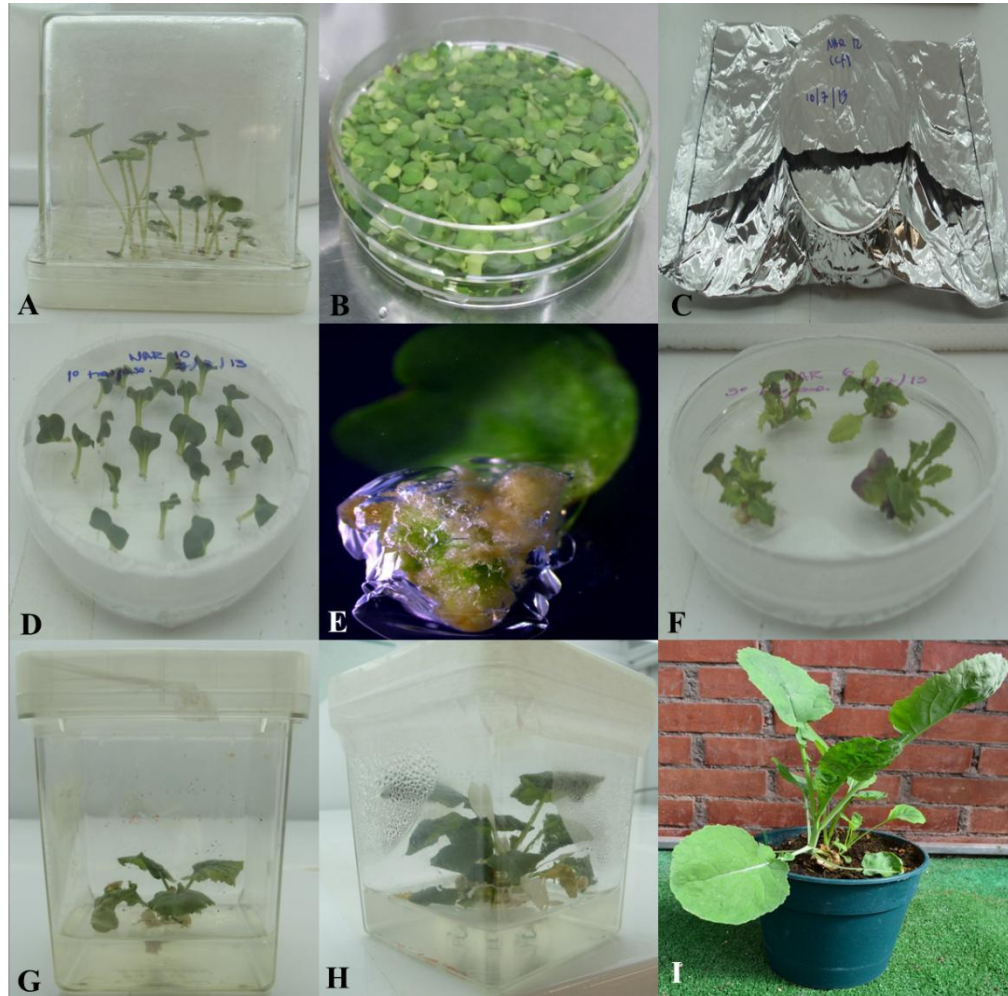


Figura 5 Proceso de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.
A: Generación de explantes; **B:** Inoculación; **C:** Cocultivo de cotiledones y *Agrobacterium*; **D:** Selección y regeneración de brotes; **E:** Callo; **F:** Generación de brotes; **G:** Elongación de brote; **H:** Enraizamiento de brotes; **I:** Planta en invernadero.

3.7 Evaluación de plantas transgénicas

3.7.1 Extracción de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) por método CTAB. El tejido congelado se pulverizó utilizando un pistilo. Se agregó 500 ul de Buffer de extracción (NaCl 1,4 M; Tris 100 mM, pH 8; EDTA 20 mM, pH 8.0; CTAB 2%; B-mercaptoetanol 0,2%) y se incubó por 1 hora a 60°C. Luego se agregó 500 ul de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó por 2 minutos y se centrifugó por 15 minutos a 13000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se le agregó 50 ul de CTAB 10% (CTAB 10%; NaCl 0,7 M). Se mezcló gentilmente y se incubó a 60°C por 10 minutos. Luego se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos y se le agregó 500 ul de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La mezcla se centrifugó por 15 minutos a 13000 rpm y la fase superior se transfirió a un tubo limpio, al cual se le agregó 500 ul de isopropanol frío. Se incubó por 30 minutos a -20°C y se centrifugó por 15 minutos a máxima velocidad. Se eliminó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con buffer de lavado (etanol 75%; acetato de amonio 10 mM) seguido por centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos. Una vez realizado el tercer lavado, los pellets se secaron a temperatura ambiente y luego a 60°C en termoblock. Una vez que el etanol se evaporó por completo, se agregó 200 ul de agua para biología molecular y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos para resuspender el ADN.

3.7.2 Evaluación de brotes por PCR. Para evaluar si los brotes portaban el gen de interés se realizó PCR utilizando 50 ng de ADN genómico con los partidores PSG2 y PSG4 según corresponda y Kanamicina (Kn).

Los programas de PCR consistieron en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos con una etapa inicial de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, una etapa de hibridación de 30 - 35 segundos a 50 – 55°C, y una etapa de extensión de 30 – 35

segundos a 72°C. Posteriormente, se realizó una etapa de extensión final durante 5 minutos a 72°C. Finalmente los productos de PCR obtenidos se analizaron en geles de agarosa.

Los fragmentos esperados para PSG2 eran de 484 pb, para PSG4 502 pb, para Kn 366 pb, para GUS 294 pb y para Actina 900 pb.

Tabla 1 Oligonucleótidos Se muestran las secuencias de todos los oligonucleótidos empleados para evaluación de brotes por PCR y de expresión en RT-PCR.

Partidor	Secuencia (5' – 3')
PSG2 Fw	GCCACCCCTTCTTATTTCCGAA
PSG2 Rv	CCCTTCACCGGAAGAATACGAA
PSG4 Fw	CCTGTTTCTCCGGAGAAACAGAGA
PSG4 Rv	CCAACATGATGGTGTGGGTCA
Kn Fw	ACAGCTGCGCAAGGAA
Kn Rv	CTATCCTTCGCAAGACCT
GUS Fw	GAGCGTCGCAGAACATTACA
GUS Rv	TGCTGTCGGCTTTAACCTCT
Actina Fw	GAAGTGGAAATGGTGAAGGCTGGGTT
Actina Rv	TCTCTCAGCTCCGATGGTGATGACT

3.7.3 Extracción de Ácido Ribonucleico (ARN). Ya identificadas las plantas transgénicas se procedió a realizar extracción de ARN desde anteras (tejido blanco), hojas, tallos y raíces. Para ello se tomaron 30 anteras de los estadíos 3, 4 y 5 (Figura 3) y 100 mg de los otros tejidos. Para la extracción se utilizó el Kit Absolutely RNA Miniprep siguiendo las instrucciones del fabricante (Agilent Technologies, CA, USA).

3.7.4 Síntesis de ADN complementario (ADNc). Para la elaboración de ADN complementario (ADNc) se utilizó 0,5 ug/ul de templado y se preparó la reacción que consistía de oligo (dT) primer (0,1 ug/ul), first strand master mix (2X) y AffinityScript RT/RNase Block enzyme mixture (Agilent, USA). La mezcla se incubó por 5 minutos a 25°C, luego a 50°C por 33 minutos y posteriormente se detuvo la síntesis de ADNc incubando a 95°C por 5 minutos.

3.7.5 RT-PCR. Para evaluar si la expresión de los genes reporteros está dirigida sólo a tejidos esporofíticos e identificar en qué estadios de desarrollo de anteras la expresión es más fuerte, se realizó PCR al ADNc fabricado utilizando los partidores para GUS utilizando el programa previamente descrito. Se utilizó como templado 2 ul de ADNc diluído en una proporción 1:10 y como control para presencia de ADNc se amplificó el gen de actina.

3.7.6 Tinción GUS. Los tejidos se colectaron y se incubaron en solución de tinción (NaPO₄ 0,1 M; EDTA 0,5M; Triton x-100 1%; K₃Fe(CN)₆ 50 mM; x-gluc 0,1M) a 37°C por 16 horas en oscuridad. Posteriormente se realizaron 3 lavados con etanol 70% para remover pigmentos.

4. RESULTADOS

4.1 Construcción de vectores de expresión pCAMBIA::PSG2 y pCAMBIA::PSG4

Con el objetivo de evaluar la expresión dirigida por los promotores PSG2 y PSG4 en *B. napus*, un fragmento funcional en *A. thaliana* de cada promotor fue insertado río arriba de una fusión de genes reporteros GUS y GFP en el vector pCAMBIA 2300 (Figura 6). La construcción pCAMBIA::PSG2 consta de 12.712 pb y pCAMBIA::PSG4 es de 12.873 pb. Estos vectores fueron digeridos con endonucleasas para corroborar la presencia del inserto y la dirección en que éste se fusionó.

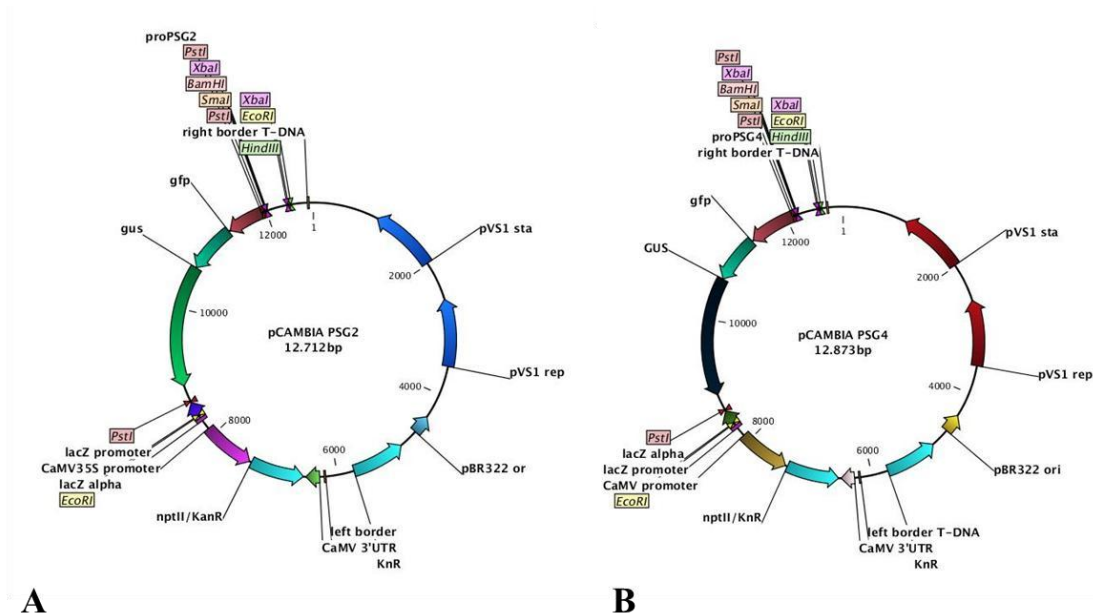


Figura 6 Vectores de expresión utilizados en el estudio. **A.** pCAMBIA::PSG2; **B.** pCAMBIA::PSG4.

Posteriormente, se transformó *A. tumefaciens* LBA4404 con cada una de los vectores.

4.2 Transformación genética y evaluación de brotes regenerados.

Tabla 2 Resumen de trabajo de transformación

ID transformación	Construcción utilizada	N° cotiledones inoculados	N° brotes invernadero	N° brotes positivos
N1	pCAMBIA::PSG2	375	19	1
N2	pCAMBIA::PSG4	335	0	0
N3	pCAMBIA::PSG2	444	6	0
N4	pCAMBIA::PSG4	417	0	0
N5	pCAMBIA::PSG2	251	29	0
N6	pCAMBIA::PSG4	702	108	0
N7	pCAMBIA::PSG2	519	40	0
N8	pCAMBIA::PSG4	929	30	0
N9	pCAMBIA::PSG2	569	15	0
N10	pCAMBIA::PSG4	144	14	0
N11	pCAMBIA::PSG2	713	24	0
N12	pCAMBIA::PSG4	399	22	0
N13	pCAMBIA::PSG2	413	11	0

Se evaluaron mediante PCR 318 brotes, de los cuales 144 fueron inoculados con la construcción pCAMBIA::PSG2 y evaluados por PCR con el set de partidores PSG2 y 174 con la construcción pCAMBIA::PSG4 y evaluados con el set PSG4 (Tabla 1, Tabla 2). Todos los brotes fueron evaluados además mediante PCR con partidores específicos para el gen de selección de brotes transgénicos, *nptII*, que otorga resistencia a la kanamicina (Tabla 1) y con oligonucleótidos para Actina para evaluar la calidad del ADN. De la totalidad de los brotes, sólo uno pudo ser confirmado positivo para la presencia del gen de resistencia a la kanamicina y del cassette de expresión portador del fragmento de promotor PSG2 fusionado al gen reportero GUS, lo que representa un porcentaje de eficiencia de

transformación del 0,03% (% eficiencia = (número de brotes transformados con cassette x/número de cotiledones transformados con cassette x)*100) para las transformaciones realizadas con pCAMBIA::PSG2. Posteriormente el resultado fue confirmado amplificando el gen GUS.

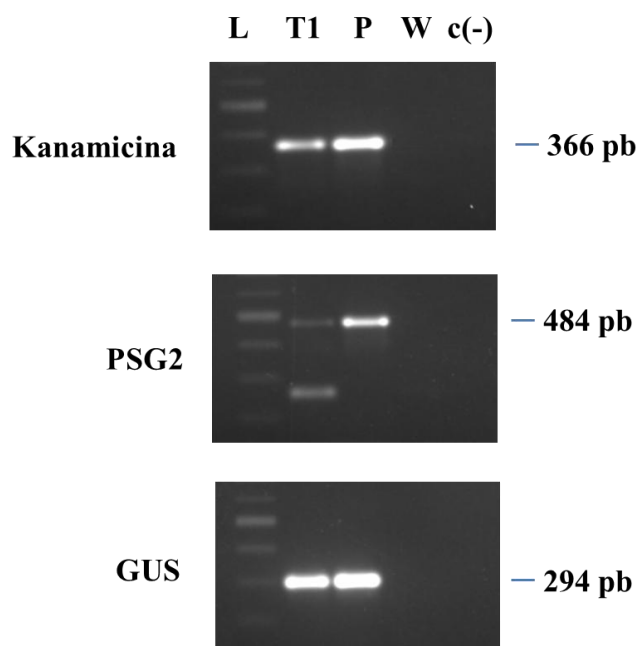


Figura 7 Evaluación de evento de transformación

L. marcador de peso molecular 100 pb; **T1.** ADN evento transgénico; **P.** pCAMBIA::PSG2; **W.** ADN control westar; **c(-).** Control negativo (agua).

4.3 Evaluación de la especificidad de expresión dirigida por el promotor PSG2.

Con la finalidad de determinar el patrón de expresión del gen reportero GUS bajo la dirección del promotor PSG2, se realizó una extracción de ARN total de tejidos esporofíticos (raíz, hoja, tallo) y de tejidos que contienen polen (anteras estadio 1 al 5) (Figura 8). A partir de estos ARNs se sintetizaron los ADNc correspondientes, los cuales fueron utilizados como templado en reacciones de RT-PCR con oligonucleótidos específicos para las regiones

codificantes del gen reportero GUS (Tabla 1). Los tamaños amplificados a partir de ADNc para GUS fueron de 294 pb y 725 pb para Actina (Figura 8A-B). Mediante esta técnica se obtuvo amplificación de los transcritos en anteras estadíos 1, 2, 3, 4 y 5. Los tejidos hoja y tallo muestran bandas de DNA correspondientes a los transcritos del gen GUS pero en menor intensidad al comparar con las anteras. En raíz no hubo presencia de transcritos. Como control positivo se amplificó ADN del plásmido pCAMBIA::PSG2 y como control negativo se amplificó ADNc de planta Westar sin transformar (Figura 8.B). Además, para corroborar la presencia de ADNc en todas las muestras se evaluó la presencia de un transcrito constitutivo como la actina con los mismos tejidos y controles (Figura 8.B).

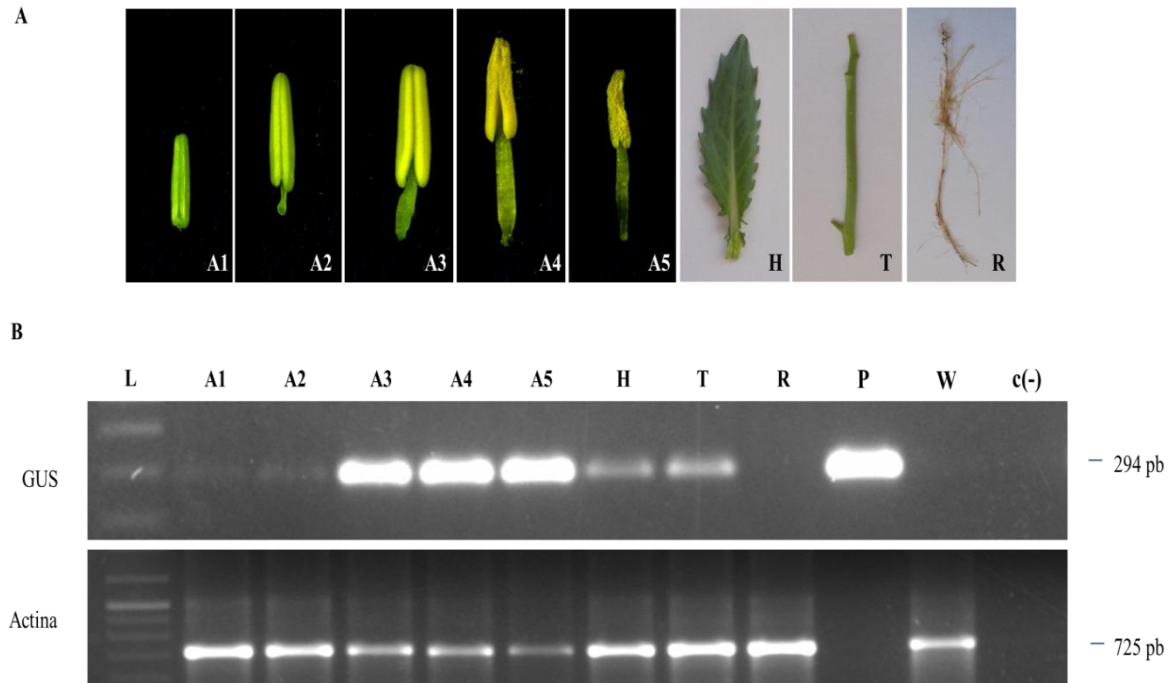


Figura 8 Análisis de expresión dirigida por proPSG2.

A. A1 – A5. Antera estadio 1 – 5; **H.** Hoja; **T.** Tallo; **R.** Raíz. **B. L.** Ladder 100 pb; **A1 – A5.** ADNc Antera estadio 1 – 5; **H.** ANDc hoja; **T.** ADNc tallo; **R.** ADNc raíz; **P.** pCAMBIA::PSG2; **W.** ADNc antera Westar; **c(-).** Control negativo (agua)

Se evaluó la tinción generada por la expresión de la enzima β -glucuronidasa en tejidos verdes (hoja y tallo), en raíz y en distintos estadios de desarrollo de anteras (Figura 9).

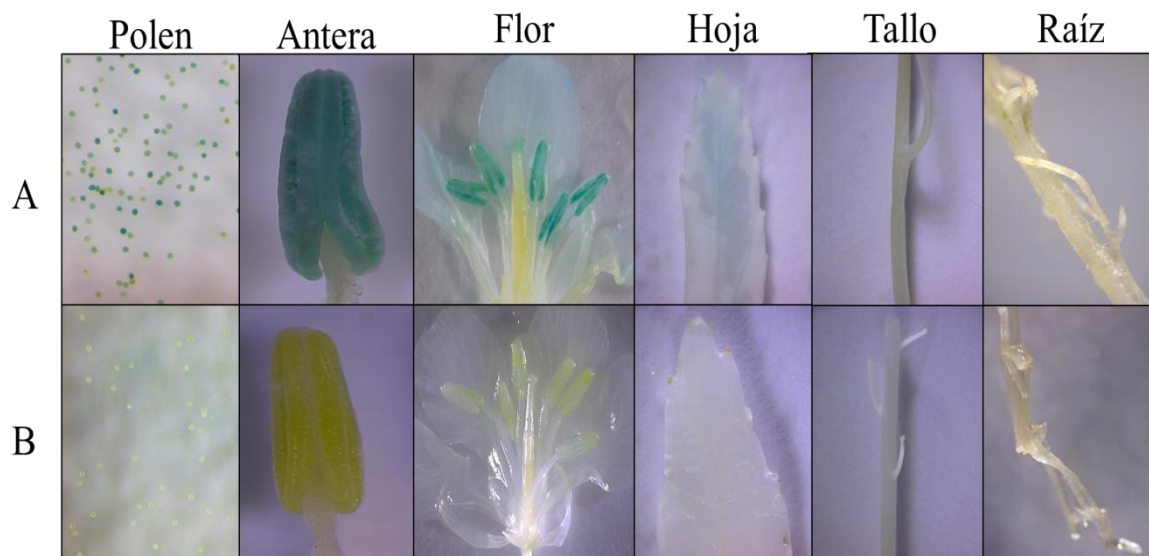


Figura 9 Análisis histoquímico de evento transgénico pCAMBIA::PSG2

A. Evento transgénico pCAMBIA::PSG2; **B.** Control Westar.

La planta transformada con proPSG2 fusionado a GUS no presentó tinción GUS en sus tejidos esporofíticos pero sí en polen y en las anteras de las flores en estadios de desarrollo 4 y 5. El control negativo correspondiente a una planta cv. Westar no presentó tinción en ninguno de los tejidos analizados.

5. DISCUSIÓN

La eficiencia de la transformación mediada por *Agrobacterium* es determinada por el número de plantas independientes que contiene el gen de interés en relación a la cantidad de explantes infectados. La cantidad de plantas establemente transformadas dependerá del genotipo de la especie que es modificada genéticamente, de la cepa de *Agrobacterium* utilizada para infectar los explantes, lo que determina su virulencia, del marcador de selección de transformantes utilizado que en este caso corresponde a la resistencia a kanamicina, de la capacidad de regeneración de las células blanco y la accesibilidad que tiene la bacteria a las células. Una variable poca veces considerada es la mantención que requiere la técnica para obtener brotes evaluables. Si el período de selección en los distintos medios de cultivo se prolonga, se requiere mayor número de trasposos de los tejidos, ya que la selección se realiza utilizando antibióticos sensibles a condiciones en el ambiente (por ejemplo, intensidad lumínica como en el caso de la kanamicina).

La metodología de RT-PCR permite determinar la presencia o ausencia de un transcrito bajo una condición determinada o en algún tejido. Con el objetivo de evaluar si los promotores de los genes de Arabidopsis PSG2 y PSG4 mantienen la expresión dirigida exclusivamente a polen en *B. napus*, se realizó RT-PCR a partir de ARN total de anteras (estadios A1 - A5), tallo, hoja y raíz. De acuerdo a la hipótesis se esperaba encontrar presencia de transcritos del gen reportero GUS en el polen y tejidos que los contienen (anteras) y no detectar acumulación de éstos en los tejidos esporofíticos analizados. En la Figura 8 se observa una electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por PCR utilizando como molde el ADNc preparado de los diferentes tejidos. Se puede apreciar que en raíz no se detecta presencia de transcritos del gen reportero, en hoja y tallo se detecta una señal más débil respecto de la que se observa en los estadios 3, 4 y 5 de desarrollo de anteras. El estadio 3 corresponde a la última etapa antes de que ocurra la apertura del botón, y es en esta etapa en donde el polen madura. En el estadio 4 y 5 la flor ya está abierta y se produce la liberación de los granos de polen por la

dehiscencia de las anteras. Hay que considerar que uno de los criterios para seleccionar secuencias de la base de datos de microarreglos consistió en que las secuencias investigadas se debían expresar en polen maduro, lo que coincide con la señal débil obtenida en los dos primeros estadios de desarrollo. Sin embargo, se detectó presencia de transcritos en los tejidos hoja y tallo bajo la dirección de proPSG2 lo que se puede deber a una expresión basal baja dirigida en estos tejidos verdes (Figura 8). Como control positivo de la técnica se amplificó parte del gen que codifica para actina, lo que permite confirmar la presencia de ADNc en todas las muestras y que la presencia o ausencia de transcrito en los diferentes tejidos no se debe a una mayor o menor cantidad de ADNc. En los últimos estadios de desarrollo de anteras se observa una banda de menor intensidad, esto se debe posiblemente a que la proporción de tejido muerto es mayor que en los estadios más tempranos de desarrollo.

Los resultados previamente descritos fueron complementados realizando ensayo GUS en los tejidos evaluados. La planta transformada con pCAMBIA::PSG2 presentó tinción solamente en anteras y polen, mientras que el control negativo, correspondiente a una planta cv. Westar sin transformar, no presentó tinción en ninguno de los tejidos estudiados (Figura 9). Estos resultados contrastan con los obtenidos de la amplificación de ADNc desde hoja y tallo en la planta transgénica. Esto puede deberse a que se requiere una mayor cantidad de enzima β -glucuronidasa a la que se sintetiza en estos tejidos para observar tinción.

Es necesario sin embargo evaluar la expresión de genes regulados por estos promotores contrastando con más eventos transformados, pues la especificidad y la eficiencia de los promotores puede verse afectada por el lugar en el que se inserta el T-DNA en el genoma blanco. Cada evento transformado es independiente, y por lo tanto, el efecto de posición del cassette de expresión en el genoma de cada evento será diferente. Al mismo tiempo es necesario realizar una comparación con proPSG4, que fue reportado como un promotor débil en *A. thaliana*. Además se encuentra diseñado un protocolo de PCR en tiempo real para cuantificar la diferencia en expresión entre estadios de anteras y tejidos no esporofíticos. Aún así, los resultados obtenidos otorgan información preliminar que permiten aseverar que la especificidad del promotor PSG2 es retenida *B. napus* y que posteriormente se pueden

reemplazar los genes reporteros, por ejemplo, genes citotóxicos para la generación de plantas macho estériles o resistentes a plagas.

6. CONCLUSIONES

Se construyeron dos vectores de expresión, pCAMBIA::PSG2 y pCAMBIA::PSG4, los cuales contienen los promotores de *Arabidopsis thaliana* PSG2 (pollen specific gene 2) y PSG4 (pollen specific gene 4), respectivamente, fusionados al gen reportero glucuronidasa (GUS).

Se obtuvo un evento transgénico de *Brassica napus* cv. Westar con el vector pCAMBIA::PSG2 utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, en el que se determinó la presencia de expresión del gen reportero en anteras en distintos estadios de desarrollo floral y actividad enzimática (GUS) en polen maduro del evento transgénico generado.

No se observó presencia de transcritos del gen reportero ni actividad enzimática en raíces del evento transgénico generado

Se observó presencia de transcritos del gen reportero en tejidos verdes (hojas y tallo) del evento transgénico generado, pero sin observarse actividad enzimática en los mismos. Esto indicaría que la expresión del gen reportero dirigida por proPSG2 es lo suficientemente baja y que proPSG2 preferencialmente dirige la expresión hacia los granos de polen maduros.

7. REFERENCIAS

- BECKIE, H., WARWICK, S., NAIR, H., SÉGUIN-SWARTZ, G.** (2003). Gene flow in commercial fields of herbicide-resistant canola (*Brassica napus*). *Ecological Applications*. 13:1276–1294.
- BELTRÁN, J., ROQUE, E., MEDINA, M., MADUEÑO, F., GÓMEZ, M., CAÑAS, L.** (2007). Androesterilidad inducida mediante ingeniería genética en plantas: fundamentos y aplicaciones biotecnológicas. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 73 (4): 1237-1264.
- BURGESS, L.** (1977). Flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) attacking rape crops in the Canadian prairie provinces. *Can. Entomol.* 109: 21- 32.
- CÁRDENAS, P., GAJARDO, H., HUEBERT, T., PARKIN, I., INIGUEZ-LUY, F., FEDERICO, M.** (2012). Retention of triplicated phytoene synthase (PSY) genes in *Brassica napus* L. and its diploid progenitors during the evolution of the Brassiceae. *Theoretical and Applied Genetics*. 124: 1215–1228.
- CULTIVOS ANUALES: SUPERFICIE, PRODUCCIÓN Y RENDIMIENTOS.**
ODEPA.<http://www.odepa.cl/cultivos-anuales-superficie-produccion-y-rendimientos-4/>. (consultado 5 Enero, 2014).
- DAVEY, M., PATIL, R., LOWE, K., POWER, J.** (1995). *Agrobacterium*-Mediated Antibiotic Resistance for Selection of Somatic Hybrids. *Methods in Molecular Biology*. 44: 167-183.
- DE WILDE C, VAN HOUDT H, DE BUCK S, ANGENON G, DE JAEGER G, DEPICKER A.** (2000). Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of transgene silencing. *Plant Molecular Biology*. 43(2-3):347-59.
- DEHESH K., JONES, A., KNUTZON, D., VOELKER, T.** (1996). Production of high levels of 8:0 and 10:0 fatty acids in transgenic canola by overexpression of *Ch FatB2*, a thioesterase cDNA from *Cuphea hookeriana*. *The Plant Journal*. 9: 167-172.
- FAO (2014).** Oilcrops, oils and meals market assessment. <http://www.fao.org/economic/est/commodity-markets-monitoring-and-outlook/oilcrops/en/> (consultado 5 Enero, 2014).
- GELVIN, S.** (2003). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67, 16–37.
- HORN, M., WOODARD, S., HOWARD, J.** (2004). Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Rep.* 22: 711–720.
- HUSKEN, A., DIETZ-PFEILSTETTER, A.** (2007). Pollen-mediated intraspecific gene flow from herbicide resistant oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Transgenic Res.* 16:557–569.

INE (2012). AGROPECUARIAS, INFORME ANUAL 2012.

http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario_de_publicaciones/pdf/agropecuarias_informe_anual_2012.pdf

- KHURANA R, KAPOOR S, TYAGI A.** (2012) Anthology of Anther/Pollen-Specific Promoters and Transcription Factors. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 31 (5).
- KNUTZON, D., THOMPSON, A., RADKE, S., JOHNSON, W., KNAUF, V., KRIDL, J.** (1992). Modification of Brassica seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 89:2624-2628.
- KUSNADI, A., NIKOLOV, Z., HOWARD, H.** (1997). Production of Recombinant Proteins in Transgenic Plants: Practical Considerations. *Biotechnology and Bioengineering*. 56: 473-484.
- LAMB, J.** (1989). Entomology of oilseed Brassica crops. *Ann. Rev. Entomol.* 34: 211-229.
- LYSAK, M., KOCH, M., PECINKA, A.** (2005). Chromosome triplication found across the tribe Brassiceae. *Genome Research*. 15: 516-525.
- MAIZEL, A., WEIGEL, D.** (2004). Temporally and spatially controlled induction of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 38: 164-171.
- MILES, M. MCDONALD, G.** (1999). Insect Pests. Capítulo 11. En: Canola in Australia: The First Thirty Years. Salisbury P.A., TD Potter, G McdDonald, AG Green, eds. Pp 53-58.
- NAGAHARU U.** (1935). Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan. J. Bot* 7: 389-452
- PARKIN, I., GULDEN, S., SHARPE, A., LUKENS L., TRICK, M., OSBORN, T., LYDIATE, D.** (2005). Segmental Structure of the *Brassica napus* Genome Based on Comparative Analysis With *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 171: 765-781.
- PARKIN, I., SHARPE A., KEITH, D., LYDIATE, D.** (1995). Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). *Genome*, 38: 1122-1131. **SCOTT, R., SPIELMAN, M., DICKINSON, H.** (2004). Stamen structure and function. *Plant Cell*, 16: 46-60.
- SLATER, S., ELLIS, S., GENAY, J., HEIMBACH, U., HUART, G., SARAZIN, M., LONGHURST, C., MULLER, A., NAUEN, R., RISONI, J., ROBIN, F.** (2010). Pyrethroid resistance monitoring in European populations of pollen beetle (*Meligethes* spp.): a coordinated approach through the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). *Pest Management Science*. 67: 633-638.
- THE PLANT LIST (2010).** Version 1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).
- THORSNESS, M.K., KANDASAMY, M.K., NASRALLAH, M.E. Y NASRALLAH, J.B.** (1993). Genetic Ablation of Floral Cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 5(3): 253-261.
- TREU, R., & EMBERLIN, J.** (2000). Pollen Dispersal in the Crops Maize (*Zea Mays*), Oil Seed Rape (*Brassica napus* ssp *Oleifera*), Potatoes (*Solanum Tuberosum*), Sugar Beet (*Beta vulgaris* ssp. *Vulgaris*) and Wheat (*Triticum Aestivum*). Evidence from

- Publications. A Report Commissioned by the Soil Association. Worcester: National Pollen Research Unit, University College Worcester.
- USDA, ARS, NATIONAL GENETIC RESOURCES PROGRAM.**
Germplasm Resources Information Network - (GRIN) [Online Database].
National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland.
<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/gnlist.pl?2665> (consultado 5 Enero, 2014).
- WALSH, J. SHARPE, A., JENNER, C., LYDIATE, D.** (1999). Characterisation of resistance to turnip mosaic virus in oilseed rape (*Brassica napus*) and genetic mapping of TuRB01. *Theoretical and Applied Genetics*. 99:1149–1154.
- WANG, J., CHEN, Z., DU, J., SUN, Y., LIANG, A.** (2005) Novel insect resistance in *Brassica napus* developed by transformation of chitinase and scorpion toxin genes. *Plant Cell Rep.* 24: 549–555.
- WANG, Y., NOWAK, G., CULLEY, D., HADWIGER, L., FRISTENSKY, B.** (1999). Constitutive Expression of Pea Defense Gene DRR206 Confers Resistance to Blackleg (*Leptosphaeria maculans*) Disease in Transgenic Canola (*Brassica napus*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 12: 410–418.