

## CONTENIDO DEL INFORME TÉCNICO

### PROGRAMA DE FORMACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

#### 1. Antecedentes Generales de la Propuesta

Nombre: Simona De Felice

Código: FP-V-2002-1-A-020

Entidad Responsable Postulante Individual: INIA – La Platina

Coordinador: Dr. Humberto Prieto

Lugar de Formación (País, Región, Ciudad, Localidad):

Inglaterra, Berk Shire, Reading, University of Reading

Tipo o modalidad de Formación: Pasantía

Fecha de realización: 2 Julio 2002 – 1 Septiembre 2002

Participantes: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

| Nombre                       | Institución/Empresa | Cargo/Actividad                     | Tipo Productor (si corresponde) |
|------------------------------|---------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| Simona De Felice             | INIA – La Platina   | Investigador,<br>área Biotecnología |                                 |
| Sergio Diez de Medina Roldán | INIA – La Platina   | Investigador,<br>área Biotecnología |                                 |

Problema a Resolver: detallar brevemente el problema que se pretendía resolver con la participación en la actividad de formación, a nivel local, regional y/o nacional.

Esta gira tecnológica surge de la necesidad de perfeccionamiento en el área biotecnológica para la evaluación de híbridos interespecíficos entre *Brassica napus* transgénica y sus relativas silvestres, un riesgo medioambiental tras la incorporación de cultivos genéticamente modificados sobre la biodiversidad silvestre chilena.

### Objetivos de la Propuesta

Entrenar a investigadores en el área de la evaluación de riesgo medioambiental tras la incorporación de cultivos genéticamente modificados sobre la biodiversidad silvestre local. Esta capacitación persiguió que los investigadores participantes adquirieran criterios, modos de operación y de planificación, ante estudios que involucran el manejo de material transgénico y su interacción con el medioambiente.

**2. Antecedentes Generales:** describir si se lograron adquirir los conocimientos y/o experiencias en la actividad en la cual se participó (no más de 2 páginas).

La presente propuesta tuvo su origen en el contexto del proyecto FIA O1-A-14 "Desarrollo de un sistema de trazabilidad molecular y de evaluación sobre la biodiversidad local de plantas modificadas genéticamente a través de transgenia". Este Proyecto consta de un sistema concebido bajo dos componentes: a) un sistema de trazabilidad molecular de semillas y granos de cultivos genéticamente modificados (GM), preferentemente importados y b) un sistema de monitoreo, estudio y evaluación del flujo génico que existe entre cultivos GM y sus relativos silvestres presentes en el país.

La elaboración de dicho proyecto, resultó gracias a la generación de vínculos férreos entre tres grupos de investigación. El primero lo constituye el grupo



conformado por INIA - La Platina, de experiencia en el área de transgenia, biología molecular y marcadores genéticos; el segundo grupo es aquel conformado por el Dr. Mike Wilkinson, de University of Reading, Reading, Inglaterra, grupo de gran preponderancia en el área de “gene flow” y “risk assessment” en Europa y el tercer grupo, el constituido por laboratorios y oficinas reguladoras de las instalaciones del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de Lo Aguirre y Central (CALT-SAG).

Producto de esta alianza cooperativa, surgió la presente aplicación a una gira tecnológica de perfeccionamiento, en la que se ha contempló que dos integrantes del grupo de investigación de INIA - La Platina, analizaran en terreno el área de detección de híbridos entre plantas transgénicas y sus relativas silvestres, en un Centro de gran experiencia en el tema. Este Centro de Investigación posee una trayectoria a nivel mundial en cuanto a estudios de flujo génico se refiere, generando gran cantidad información, reportada en revistas científicas del impacto de *Molecular Ecology* (ver por ejemplo 9, 983-991 (2000)), *Nature Biotechnology* (ver por ejemplo 17, 390-392.(1999)) y *Nature* (ver por ejemplo 393:320 (1998)), convirtiéndose así en un Centro Referencial en este tipo de investigaciones.

Tras esto, se han traído a Chile el tipo de técnicas utilizadas en U. Reading, permitiendo la mezcla de las concepciones biológico-agronómica y biológico-molecular, según los siguientes objetivos específicos:

1. Incorporación al programa de evaluación de flujo génico para Brassica.
  - 1.1. Participar en ensayos de campo para la selección de material a ser analizado.
  - 1.2. Realizar hibridación manual en invernaderos con plantas GM.
  - 1.3. Analizar el material colectado y generado en invernaderos mediante la utilización de marcadores moleculares
  
2. Transferencia y aplicación del modelo Brassica utilizado en Inglaterra al sistema de evaluación y monitoreo chileno para Brassica, papa y maíz, en el marco del Proyecto FIA 01-A-014.

3. Itinerario Realizado: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

| 8.- ITINERARIO PROGRAMA DE TRABAJO |   |  |         |
|------------------------------------|---|--|---------|
| FECHA<br>(Día-mes-año)             | ACTIVIDAD   | OBJETIVO   | LUGAR   |
| 3 Julio – 17 Julio<br>2002         | Entrenamiento básico en técnicas moleculares empleadas en la evaluación del flujo génico  | 1. Incorporación al programa de evaluación de flujo génico para Brassica.<br>1.2. Realizar hibridación manual en invernaderos con plantas GM.<br>1.3. Analizar el material colectado y generado en invernaderos mediante la utilización de marcadores moleculares (y PCR)            | Reading |
| 18 Julio – 31 Julio<br>2002        | Entrenamiento en técnicas de muestreo para el estudio de flujo génico entre cultivos domesticados y relativos silvestres              | 1. Incorporación al programa de evaluación de flujo génico para Brassica.<br>1.1. Participar en ensayos de campo para la selección de material a ser analizado.  | Reading |
| 1 Agosto – 15<br>Agosto 2002       | Entrenamiento en el sistema de registro y manipulación de datos para eventos secuenciales biológicos                                  | 1. Incorporación al programa de evaluación de flujo génico para Brassica.<br>2. Transferencia y aplicación del modelo <i>Brassica</i> utilizado en Inglaterra al sistema de evaluación y monitoreo chileno para <i>Brassica</i> , papa y maíz, en el marco del Proyecto FIA O1-A-14. | Reading |
| 16 Agosto – 1<br>Septiembre 2002   | Establecimiento de protocolos para realizar prospecciones para estudios de simpatria entre cultivos domésticos y relativos silvestres | 1. Transferencia y aplicación del modelo <i>Brassica</i> utilizado en Inglaterra al sistema de evaluación y monitoreo chileno para <i>Brassica</i> , papa y maíz, en el marco del Proyecto FIA O1-A-14.  | Reading |

Señalar las razones por las cuales algunas de las actividades programadas no se realizaron o se modificaron.



### 3.1 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. 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.

### 3.2 Análisis de material colectado y generado en invernadero mediante la utilización de marcadores moleculares

Las plantas utilizadas para los análisis de laboratorio se habían recolectado en campo y generado en invernadero anteriormente a nuestra visita. Se analizaron híbridos de *B. rapa* X *B. napus* y *B. napus* X *B. rapa*.

#### 3.2.1 Extracción de DNA.

El protocolo que se utilizó para efectuar la extracción de DNA desde las plantas de *Brassica* es brevemente indicado:

- Se maceró material fresco (hojas) en morteros con nitrógeno líquido y se agregaron 600 µl de solución amortiguadora de extracción SDS



(disodium-EDTA 50 mM pH 8,0, Tris-HCl 100 mM pH 8,8, NaCl 500 mM, SDS 1,25 (w/v), NaOH 8,3 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2% (v/v)). Se incubó por 20 min a 65° C.

- Luego, los tubos incubados, se dejaron a temperatura ambiente 5 minutos antes de adicionarles 182  $\mu$ l de buffer de precipitación (Acetato de potasio 5M) y se homogeneizó hasta formar una emulsión. Se incubó a -20 °C por 15 min.
- Se centrifugó a 14.000 rpm por 5 min.
- Se tomaron 400  $\mu$ l de fase acuosa y se le adicionaron 280  $\mu$ l de isopropanol frío, a continuación se agitó en forma suave, para luego almacenarlo por 20 minutos a -20° C.
- Luego de la incubación, se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos. El "pellet" resultante se lavó con etanol al 70% y se dejó secar.
- El "pellet" se resuspendió en 150  $\mu$ l de solución TE y se les adicionaron 2  $\mu$ l de RNAasa A ( 10 mg/ml), se incubó a 37° C por 15 minutos. Las muestras finalmente se almacenaron a 4° C hasta el día siguiente.
- Se centrifugó a 14.000 rpm por 2 minutos y se tomaron 100  $\mu$ l de TE. Los restantes 50  $\mu$ l se ocuparon para cuantificar el ADN.

### 3.2.2 Determinación de la calidad del DNA y cuantificación

La cantidad de ADN 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 ADN 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 realizó 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.

### 3.2.3. Análisis de los potenciales híbridos.

#### 3.2.3.1 Identificación de la planta madre mediante amplificación de ADN de cloroplastos

Se utilizaron partidores diseñados a partir de secuencias de cloroplastos para amplificar ADN de herencia materna.

Las mezclas de reacción (40  $\mu$ l) contenían una unidad de 20 ng de DNA genómico de *Brassica*, dos unidades de Taq DNA polimerasa, 4,0  $\mu$ l de amortiguador de reacción 10X (a una concentración final de 1X), 1,6  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (50 mM) a concentración a final de 2,0 mM, 4,0  $\mu$ l de mezcla de dNTPs (Boehringer Mannheim, 5 mM cada nucleótido) a concentración final de 0,25 mM, y 1,2  $\mu$ l de partidor (10 mM) a una concentración final de 0,2  $\mu$ M.

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.

#### 3.2.3.2 Digestión de los productos de amplificación mediante enzimas de restricciones

Se utilizaron distintos enzimas de restricciones para digerir los productos amplificados con los partidores específicos para cloroplastos. La mezcla de reacción (20  $\mu$ l) contenía 0,1  $\mu$ l de enzima (1 U), 2  $\mu$ l de Buffer específico por cada enzima, 12,9  $\mu$ l de agua bidestilada y 5  $\mu$ l de amplificado.

La digestión se efectuó a 37° C por 2 horas.

### 3.2.3.3 Diseño de partidores específicos para genes.

Se diseñaron partidores específicos para algunos genes utilizando las informaciones presente en el web “Brassica database” y utilizando un programa computacional, generunner.

En la totalidad se diseñaron 12 parejas (Tabla 1) de partidores que amplificaron en las tres especie de interés de Brassica: *Brassica napus*, *B. rapa* y *B. oleracea*.

**Tabla 1:** Partidores específicos para genes

| 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'TGATTCTCTTGTAACACACAACCT 3'   | 4-coumarate-CoA ligase         |
| 4CL-A2-F | 5' TACAAAaggTTTTCAAgTggCTCCg 3' | 4CL-A2-R | 5' AggACATTgTCgTTAACCCCTAggC 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                      |

### 3.2.3.4 Amplificación de genes específicos mediante PCR.

Los partidores utilizados para discriminar individuos mediante PCR se diseñaron durante las primeras dos semanas de estadía en The University of Reading y se utilizaron para amplificaciones por PCR siguiendo el protocolo descrito por Charters *et al.* (1996) con modificaciones menores.

Las mezclas de reacción (40  $\mu$ l) contenían una unidad de 20 ng de DNA genómico de *Brassica*, dos unidades de Taq DNA polimerasa, 4,0  $\mu$ l de amortiguador de reacción 10X (a una concentración final de 1X), 1,6  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (50 mM) a concentración a final de 2,0 mM, 4,0  $\mu$ l de mezcla de dNTPs (Boehringer Mannheim, 5 mM cada nucleótido) a concentración final de 0,25 mM, y 1,2  $\mu$ l de partidador (10 mM) a una concentración final de 0,2  $\mu$ M.

Las reacciones de PCR siguieron el patrón: 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.

### 3.2.3.5 Digestión de los productos de amplificación mediante enzimas de restricciones

Se utilizaron distintas enzimas de restricciones para digerir los productos amplificados con los partidores específicos para genes específicos. La mezcla de reacción (20  $\mu$ l) contenía 0,1  $\mu$ l de enzima (1 U), 2  $\mu$ l de Buffer específico por cada enzima, 12,9  $\mu$ l de agua bidestilada y 5  $\mu$ l de amplificado.

La digestión se efectuó a 37° C por 2 horas.

### 3.3 Toma de muestra y recolección de individuos potenciales híbridos.

Se hicieron días de campo para la selección de material a ser analizado.

Gracias al conocimiento del fenotipo de los híbridos formados en invernadero, se buscaron a los bordes de predios y entre predios de canola convencional plantas con características de híbridos.

Se recolectaron muestras de hojas, dos por cada sospechoso híbrido, en estado fenológico joven para permitir su análisis con citometría de flujo y marcadores moleculares.

Todas las hojas colectadas se transportaron en bolsas de plástico hacia el laboratorio de Plant Sciences. Una vez en el laboratorio, una hoja se almaceno en tubo 1,2 ml paletizados a  $-20^{\circ}\text{C}$  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, llamados "bulks", de 10 bolsas cada uno. Las muestras se enviaron a Holanda donde fueron analizadas por citómetro de flujo.

### 3.4 Tránsito y aplicación del modelo utilizado en Inglaterra al sistema de evaluación y monitoreo chileno para Brassica, papa y maíz, en el marco del Proyecto FIA 01-A-14

Se discutió con el profesor Mike Wilkinson, la realidad chilena de los organismos genéticamente modificados.

Se ilustró especialmente la realidad del cultivo de Brassica y de papa. A tal propósito se sugirió para el cultivo de Brassica:

- programar las visitas a los predios chilenos (año de cuarentena o) especialmente en dos épocas: unos días antes y después las fumigaciones con herbicidas para evaluar la presencia de plantas resistentes;

- contar el número de malezas presentes a los alrededores más próximos de los predios y en los predios (año de cuarentena 0), antes y después el tratamiento con herbicida;
- recolectar silicuas maduras de *B. rapa*, si presente como maleza, en los predios cultivados con eventos GM, para evaluar en invernadero la formación espontánea de híbridos.
- visitar los predios en cuarentena (año 1, 2, 3 y 4) para evaluar la presencia de escape de plantas GM y de posibles híbridos.

Para el cultivo de papa se sugirió:

- visitar los predios en cuarentena (año 1, 2, 3 y 4) para evaluar la presencia de escape de papas GM;
- recolectar *Solanum maglia*, especie endémica de Chile, para efectuar cruzamientos manuales de tal especie con plantas de papa, *Solanum tuberosum*.

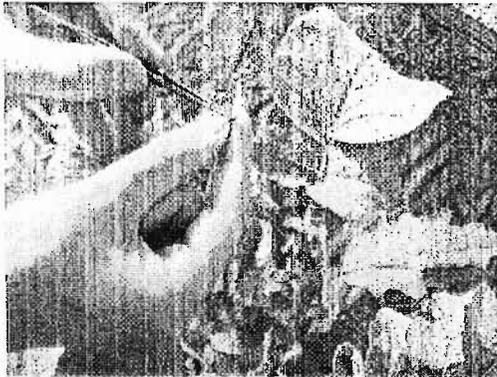
**4. Resultados Obtenidos:** descripción detallada de los conocimientos adquiridos. Explicar el grado de cumplimiento de los objetivos propuestos, de acuerdo a los resultados obtenidos. Incorporar en este punto fotografías relevantes que contribuyan a describir las actividades realizadas.

#### 4.1 Hibridación manual en invernaderos de *Brassica* sp.

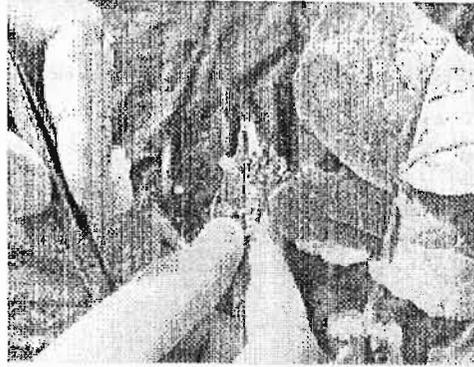
La figura muestra una secuencia de hibridación cruzada efectuada en invernadero utilizando como hembra *B. rapa* y como macho *B. napus*.

**Figura 1:** Cruzamiento manual

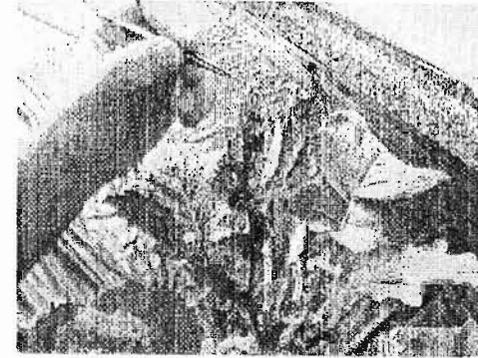
a) eliminación de las flores abiertas; b) eliminación de los pétalos y estambres; c) polinización cruzada; d) etiqueta y e) bolsa microperforada.



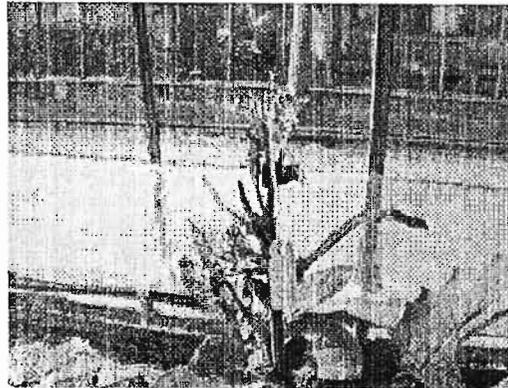
a



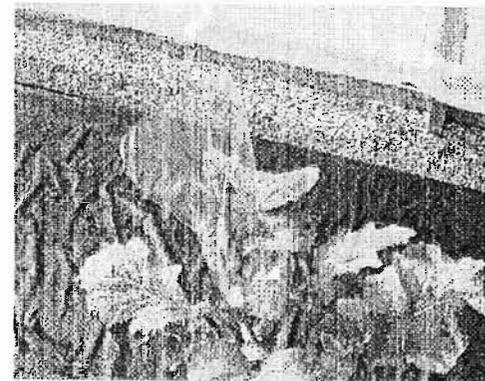
b



c



d

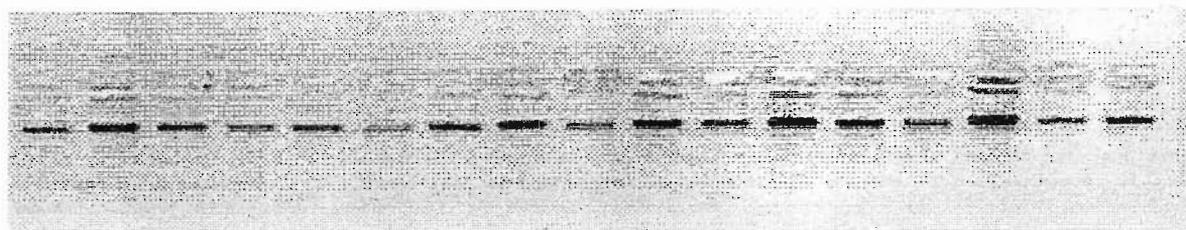


e

## 4.2. Extracción de ADN

En la Figura 2 se muestran los ADN extraídos a partir de hojas de *Brassica* sp. recolectadas durante los días de campo y en invernadero tras la aplicación de las etapas descritas en el punto 3.2.1.

**Figura 2: Gel de agarosa 0.8% para visualizar ADN**



## 4.3. Análisis de los potenciales híbridos

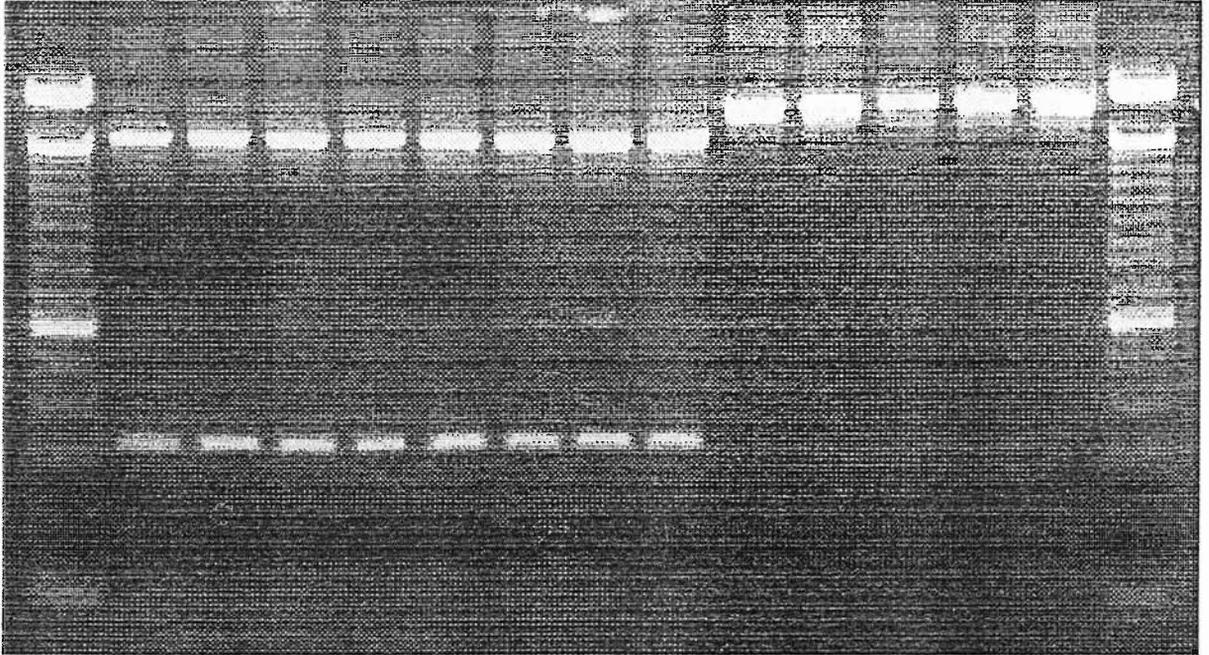
Se logró estandarizar el sistema de detección de la planta hembra amplificando el ADN con partidores específicos para cloroplastos, organillos presente solamente en el citoplasma que en el caso de la *Brassica*, como de muchas otras especies vegetales, es de herencia materna.

La simple amplificación con PCR no mostraba polimorfismo de bandas y no discriminaba entre las dos especies *napus* y *rapa*, a tal propósito se utilizaron enzimas de restricciones capaces de digerir el ADN provocando cortes en secuencias específicas, permitiendo así la caracterización del origen del citoplasma. Esto permitió establecer el origen de los híbridos detectando a qué especie pertenecían sus plantas madres.

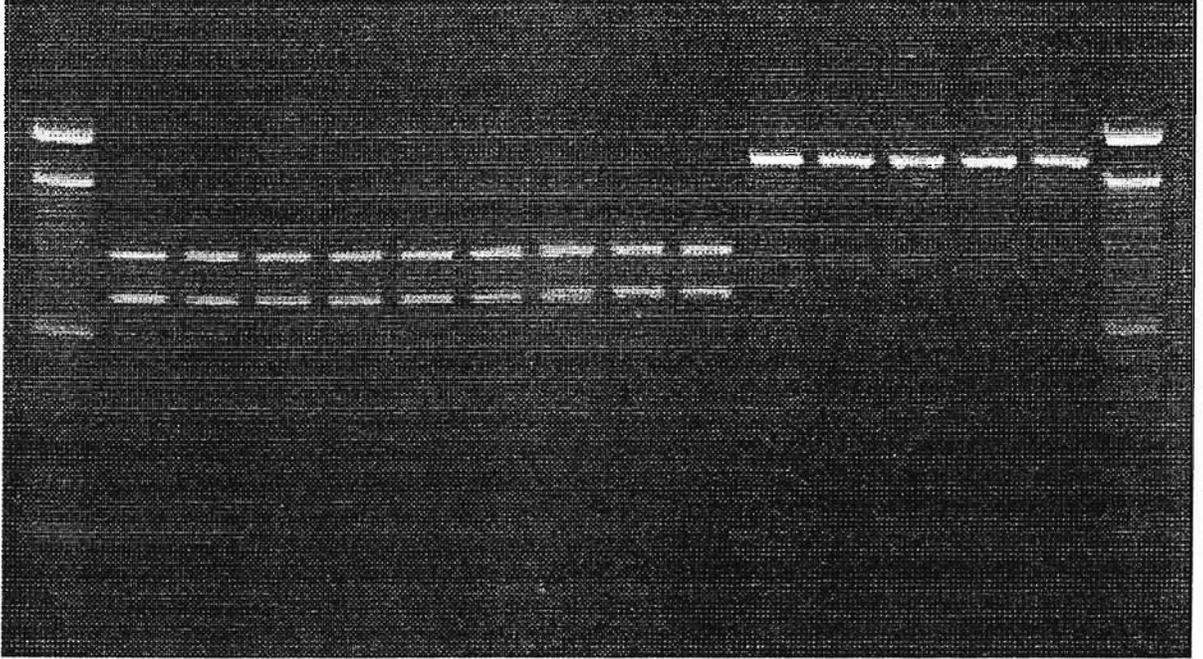
En dichas Figuras 3 y 4, se puede observar que las muestras analizadas presentan el patrón de *B. napus*, especie cultivada (no silvestre, ni maleza) y correspondiente al mismo tipo de cultivo GM utilizado en Chile. Para una interpretación más completa de estos resultados, se deben combinar con la

información obtenida de la citometría de flujo y los otros marcadores utilizados y descrita a continuación.

**Figura 3:** Amplificación con partidor O para cloroplastos digerida con Eco RI



**Figura 4:** Amplificación con partidor Q para cloroplastos digerida con Vsp I



#### 4.4. Diseño de partidores específicos para genes.

En forma adicional a las secuencias específicas para cloroplastos típicamente utilizadas para evaluar la herencia materna del citoplasma en *Brassica*, se desarrollaron nuevos marcadores específicos para algunos genes, que amplifican zonas genómicas en las tres especies de interés de *Brassica*. De esta manera, se permitió confirmar la información obtenida por citometría de flujo. Esto fue de gran importancia hacia el final de este trabajo, en donde se pretendía desarrollar una herramienta útil para identificar híbridos interespecíficos.

Las 12 parejas de partidores lograron amplificar productos. Se utilizaron distintas muestras para probar los partidores: *B. napus*, *B. oleracea*, *B. rapa* (silvestre), *B. rapa* (maleza), un híbrido *B. rapa x B. napus*.

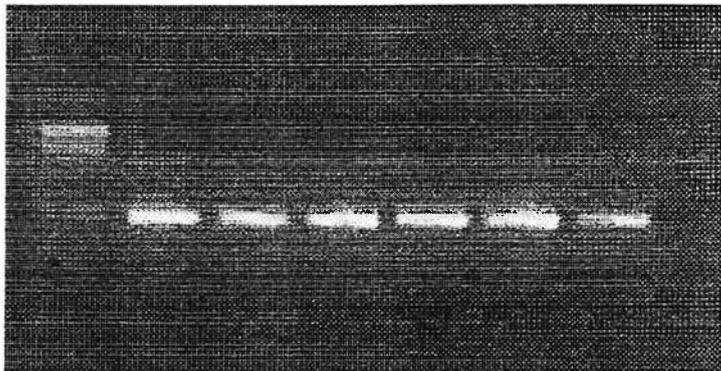
Siempre el resultado era una sola banda monomórfica de distintos tamaños dependiendo del partidador (Tabla 2):

**Tabla 2:** Tamaños de las bandas monomórficas para cada pareja de partidores

| Nombre   | Tamaños        |
|----------|----------------|
| Partidor | bandas (bp)    |
| COA1     | 480 bp         |
| COA2     | 600 bp         |
| COA3     | 864 bp         |
| CHIA1    | 380-400 bp     |
| CHIA2    | 536-557 bp     |
| CHIA3    | 713-735 bp     |
| CHI1     | 261 bp         |
| CHI2     | 291 bp         |
| CADA1    | 390 bp         |
| CADA2    | 600 bp         |
| 4CL-A1   | 425-480 bp     |
| 4CL-A2   | para confirmar |

Las figuras 5 y 6 muestran las bandas monomórficas productos de la amplificación.

**Figura 5: Bandas monomórficas amplificadas con partidor Coa2**

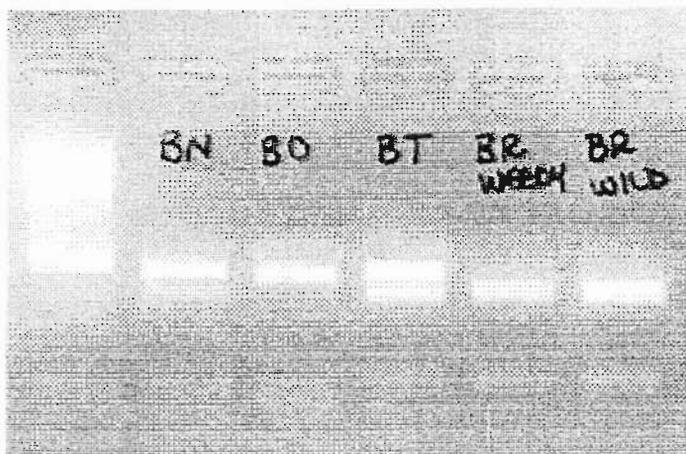


**Figura 6: Bandas monomórficas amplificadas con partidor Cada 2**



Considerando que, la simple amplificación con PCR no mostraba polimorfismo de bandas sin así permitir la identificación de las distintas especies, se utilizaron enzimas de restricción que permitían distinguir entre ellas (Figura 7).

**Figura 7:** Partidor CHIA1 digerido con enzima de restricción Bcl I. Las muestras corresponden a: BN = *Brassica napus*; BO = *Brassica oleracea*; BT = *Brassica* Triploide ; BR WEEDY = *Brassica rapa* maleza; BR WILD = *Brassica rapa* silvestre.



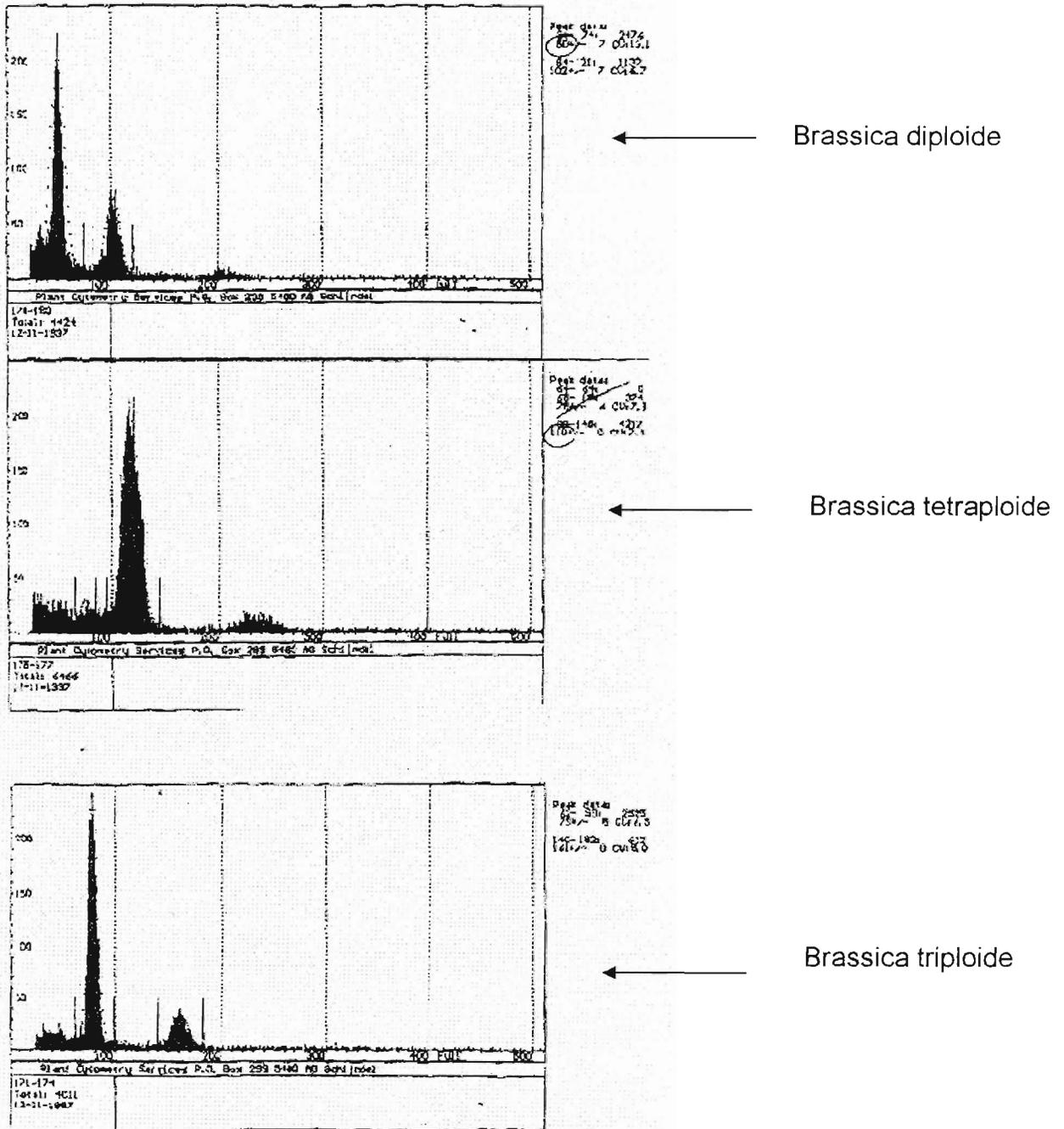
#### 4.5. Citometría de Flujo

La citometría de flujo mostró ser una técnica rápida y segura para evaluar las muestras recolectadas en campos, las plantas generada por cruzamiento dirigido en invernadero y finalmente los individuos derivados de semillas recolectas y germinadas en invernadero. Tal herramienta permite medir la cantidad de material genético presente en las células de hojas y así determinar su poliploidia.

Cada vez que se enviaban muestras era necesario enviar también un control de material diploide, la mayoría de los casos se utilizó *B. rapa*, y un control de material tetraploide correspondiente a *B. napus*.

Los híbridos, siendo formados por un tetraploide y un diploide, eran triploides y tal cantidad de ADN podía ser medida a través de un “peak” (Figura 8).

**Figura 8:** Gráfico obtenido por citometría de flujo.



## REFERENCIAS

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.

**5. Aplicabilidad:** explicar la situación actual del rubro en Chile (región), compararla con la tendencias y perspectivas en el país (región) visitado y explicar la posible incorporación de los conocimientos adquiridos, en el corto, mediano o largo plazo, los procesos de adaptación necesarios, las zonas potenciales y los apoyos tanto técnicos como financieros necesarios para hacer posible su incorporación en nuestro país (región).

La ratificación del Protocolo de Cartagena sobre el Protocolo de Bioseguridad en Biotecnología por parte de los países miembro y la firma de distintos tratados de libre comercio entre nuestro país y Europa o EE.UU. pone en una primera línea la necesidad de generar capacidad técnica nacional en el ámbito de biotecnología. En este sentido, este trabajo y el Proyecto FIA 01A014, vienen a generar núcleos propios de trabajo real en el área de la trazabilidad y evaluación del flujo génico entre cultivos. Sin duda contar con este tipo de grupos de trabajo, potencia la capacidad nacional y la autonomía en la toma de decisiones para el movimiento transfronterizo de este tipo de material.

**6. Contactos Establecidos:** presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

| Institución / Empresa | Persona de Contacto      | Cargo/Actividad          | Fono/Fax             | Dirección   | E-mail                      |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|---|-----------------------------|
| University of Reading | Dr. Mike Wilkinson       | Academico y investigador | 0044 118<br>931 8075 | Department of Agricultural Botany, Plant science Laboratories, Whiteknights PO Box 221, Reading RD6 6AS, UK | m.j.wilkinson@rdg.ac.uk     |
| University of Reading | Dr. Joel Allainguillaume | Investigador             | 0044 118<br>931 6380 | Department of Agricultural Botany, Plant science Laboratories, Whiteknights PO Box 221, Reading RD6 6AS, UK | j.allainguillaume@rdg.ac.uk |
| University of Reading | S.ta Giulia Cuccato      | candidada a doctor       | -                    |   |                             |

**7. Detección de nuevas oportunidades y aspectos que quedan por abordar:** señalar aquellas iniciativas detectadas en la actividad de formación, que significan un aporte para el rubro en el marco de los objetivos de la propuesta, como por ejemplo la posibilidad de realizar nuevos cursos, participar en ferias y establecer posibles contactos o convenios. Indicar además, en función de los resultados obtenidos, los aspectos y vacíos tecnológicos que aún quedan por abordar para la modernización del rubro.

**8. Resultados adicionales:** capacidades adquiridas por el grupo o entidad responsable, como por ejemplo, formación de una organización, incorporación (compra) de alguna maquinaria, desarrollo de un proyecto, firma de un convenio, etc.

A través de esta actividad de formación se ha logrado adquirir informaciones sobre algunas técnicas moleculares, pero fundamentalmente conocer el servicio de citometría de flujo que pudo ser incorporado al proyecto FIA BIOT / INIA

“Desarrollo de un sistema de Trazabilidad Molecular y de Evaluación sobre la Biodiversidad local de Plantas Modificadas Genéticamente a través de Transgenia”, una vez regresados a Chile.

Esta técnica, permite identificar híbridos interespecíficos en corto periodo de tiempo, lo cual no se extendería por sobre los 4 días incluyendo el envío trámite DHL, y con un costo relativamente bajo, 380 dólares por 520 muestras analizadas.

Se ha utilizado un mixer mill MM301 de marca Retsch durante la extracción de ADN. Este robot es capaz de triturar con nitrógeno líquido 192 muestras de material vegetal en pocos minutos. Su compra y incorporación sería muy útil para el laboratorio de biotecnología de INIA – La Platina.

**9. Material Recopilado:** junto con el informe técnico se debe entregar un set de todo el material recopilado durante la actividad de formación (escrito y audiovisual) ordenado de acuerdo al cuadro que se presenta a continuación (deben señalarse aquí las fotografías incorporadas en el punto 4):

## **Artículos recopilatos**

### **BRASSICA AND HERBICIDE RESISTANCE**

P.J. Gregory et al.,

Environmental consequences of alternative practices for intensifying crop production

Agriculture, Ecosystems And Environment 88 (3) (2002) pp. 279-290

(file herbicide resistance1.pdf **U. de Chile, Agronomía**)

N. Colbach, C. Clermont-Dauphin and J.M. Meynard,

GENESYS: a model of the influence of cropping system on gene escape from herbicide tolerant rapeseed crops to rape volunteers

Agriculture, Ecosystems And Environment 83 (3) (2001) pp. 235-253

(fotocopia)

N. Colbach, C. Clermont-Dauphin and J.M. Meynard,

GENESYS: a model of the influence of cropping system on gene escape from herbicide tolerant rapeseed crops to rape volunteers.

Agriculture, Ecosystems And Environment 83 (3) (2001) pp. 255-270

(fotocopia)

Nathalie Faure, Hervé Serieys and André Bervillé,  
Potential gene flow from cultivated sunflower to volunteer, wild *Helianthus* species  
in Europe

Agriculture, Ecosystems And Environment 89 (3) (2002) pp. 183-190  
(file herbicide resistance2.pdf)

Hall, L. Topinka, K. Huffman, J. Davis, L. Good,  
A Pollen flow between herbicide-resistant *Brassica napus* is the cause of multiple-  
resistant *B. napus* volunteers.

Weed Science. 2000. 48: 6, 688-694. 23 ref.  
(fotocopia **Platina**)

Madsen, K. H. Streibig, J. C

Simulating weed management in glyphosate-tolerant crops: greenhouse and field  
studies.

Pest Management Science. 2000. 56: 4, 340-344. 7 ref.  
(file herbicide resistance3.pdf)

Shaner, D. L

The impact of glyphosate-tolerant crops on the use of other herbicides and on  
resistance management.

Pest Management Science. 2000. 56: 4, 320-326. 47 ref.  
(file herbicide resistance4.pdf)

Allan T Woodburn

Glyphosate: production, pricing and use worldwide  
Pest Management Science. 2000. 56: 4, 309-312  
(file glyphosate production.pdf)

Alan D Baylis

Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects

Pest Management Science. 2000. 56: 4, 299-308

(file glyphosate herbicide.pdf)

Craig Leaper, Peter J Holloway

Adjuvants and glyphosate activity

Pest Management Science. 2000. 56: 4, 313-319

(file glyphosate activity.pdf)

Tomiuk, J. Hauser, T. P. Bagger-Jorgensen, R

A- or C-chromosomes, does it matter for the transfer of transgenes from Brassica napus.

Theoretical & Applied Genetics. 2000. 100: 5, 750-754. 20 ref.

(file herbicide resistance5.pdf)

Snow, A. A. Andersen, B. Jorgensen, R. B

Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from Brassica napus into weedy B. rapa.

Molecular Ecology. 1999. 8: 4, 605-615. 2 pp of ref.

(file herbicide resistance6.pdf)

Madsen, K. H. Blacklow, W. M. Jensen, J. E. Streibig, J. C

Simulation of herbicide use in a crop rotation with transgenic herbicide-tolerant oilseed rape.

Weed Research (Oxford). 1999. 39: 2, 95-106. 28 ref.

(file herbicide resistance7.pdf **Platina**)

Lavigne, C. Klein, E. K. Vallee, P. Pierre, J. Godelle, B. Renard, M  
A pollen-dispersal experiment with transgenic oilseed rape. Estimation of the average pollen dispersal of an individual plant within a field.  
Theoretical & Applied Genetics. 1998. 96: 6/7, 886-896. 46 ref.  
(file pollen dispersal.pdf )

Chevre, A. M. Eber, F. Baranger, A. Hureau, G. Barret, P. Picault, H. Renard, M  
Characterization of backcross generations obtained under field conditions from oilseed rape-wild radish F1 interspecific hybrids: an assessment of transgene dispersal.  
Theoretical & Applied Genetics. 1998. 97: 1/2, 90-98. 27 ref.  
(file hybrids.pdf )

Chevre, A. M. Eber, F. Baranger, A. Renard, M  
Gene flow from transgenic crops.  
Nature (London). 1997. 389: 6654, 924. 6 ref.  
(fotocopia)

Metz, P. L. J. Jacobsen, E. Nap, J. P. Pereira, A. Stiekema, W. J  
The impact on biosafety of the phosphinothricin-tolerance transgene in interspecific *B. rapa* x *B. napus* hybrids and their successive backcrosses.  
Theoretical & Applied Genetics. 1997. 95: 3, 442-450. 44 ref.  
(file hybrids2.pdf )

Lefol, E. Danielou, V. Darmency, H  
Predicting hybridization between transgenic oilseed rape and wild mustard  
Field Crops Research. 1996. 45: 1/3, 153-161. 19 ref.  
(fotocopia)

Baranger, A. Chevre, A. M. Eber, F. Renard, M

Effect of oilseed rape genotype on the spontaneous hybridization rate with a weedy species: an assessment of transgene dispersal.

Theoretical & Applied Genetics. 1995. 91: 6/7, 956-963. 35 ref.

(fotocopia **Platina**)

Denis, M. Delourme, R. Gourret, J. P. Mariani, C. Renard, M

Expression of engineered nuclear male sterility in Brassica napus. Genetics, morphology, cytology, and sensitivity to temperature.

Plant Physiology. 1993. 101: 4, 1295-1304. 45 ref.

(file male sterility.pdf)

Erickson, L. Kemble, R

Paternal inheritance of mitochondria in rapeseed (Brassica napus).

Molecular & General Genetics. 1990. 222: 1, 135-139. 12 ref.

(fotocopia)

## **HYBRIDS**

Chevre, A. M. Eber, F. Darmency, H. Fleury, A. Picault, H. Letanneur, J. C.

Renard, M

Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions.

Theoretical & Applied Genetics. 2000. 100: 8, 1233-1239. 18 ref.

(file hybrids3.pdf)

Darmency, H. Lefol, E. Fleury,

A Spontaneous hybridizations between oilseed rape and wild radish

Molecular Ecology. 1998. 7: 11, 1467-1473. 29 ref.

(file hybrids4.pdf)

Snowdon, R. J. Kohler, W. Friedt, W. Kohler,  
A Genomic in situ hybridization in Brassica amphidiploids and interspecific hybrids  
Theoretical & Applied Genetics. 1997. 95: 8, 1320-1324. 23 ref  
(pdf hybrids5.pdf)

Eber, F. Chevre, A. M. Baranger, A. Vallee, P. Tanguy, X. Renard, M  
Spontaneous hybridization between a male-sterile oilseed rape and two weeds  
Theoretical & Applied Genetics. 1994. 88: 3/4, 362-368. 28 ref.  
(fotocopia, **Platina**)

Kerlan, M. C. Chevre, A. M. Eber, F  
Interspecific hybrids between a transgenic rapeseed (*Brassica napus*) and related  
species: cytogenetical characterization and detection of the transgene.  
Genome. 1993. 36: 6, 1099-1106. 29 ref.  
(Fotocopia - **Platina**)

Kerlan, M. C. Chevre, A. M. Eber, F. Baranger, A. Renard, M  
Risk assessment of outcrossing of transgenic rapeseed to related species: I.  
Interspecific hybrid production under optimal conditions with emphasis on  
pollination and fertilization. [Journal article]  
Euphytica. 1992. 62: 2, 145-153. 33 ref.  
(fotocopia - **Platina**)

## **BRASSICA RAPA AND BRASSICA NAPUS**

Halfhill, M. D. Richards, H. A. Mabon, S. A. Stewart, C. N., Jr  
Expression of GFP and Bt transgenes in *Brassica napus* and hybridization with  
*Brassica rapa*.  
Theoretical & Applied Genetics. 2001. 103: 5, 659-667. 28 ref.  
(file b. rapa hybridisation.pdf)

Scott, S. E. Wilkinson, M. J

Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*

Nature Biotechnology. 1999. 17: 4, 390-393. 14 ref.

(fotocopia)

Hauser, T. P. Jorgensen, R. B. Ostergard, H

Fitness of backcross and F2 hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B. napus*).

Heredity. 1998. 81: 4, 436-443. 26 ref.

(file fitness hybrids1.pdf)

Hauser, T. P. Shaw, R. G. Ostergard, H

Fitness of F1 hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B. napus*).

Heredity. 1998. 81: 4, 429-435. 29 ref.

(file fitness hybrids2.pdf)

## **WILD BRASSICA**

Jorgensen, R. B. Andersen, B. Hauser, T. P. Landbo, L. Mikkelsen, T. R.

Ostergard, H Introgression of crop genes from oilseed rape (*Brassica napus*) to related wild species - an avenue for the escape of engineered genes.

Acta Horticulturae. 1998. No. 459, 211-217. 9 ref.

(fotocopia)

Crouch, J. H. Lewis, B. G. Lydiate, D. J. Mithen, R

Genetic diversity of wild, weedy and cultivated forms of *Brassica rapa*.

Heredity. 1995. 74: 5, 491-496. 18 ref.

(fotocopia)

## FINGERPRINTING

Li, G. Quiros, C. F

Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica.

Theoretical & Applied Genetics. 2001. 103: 2/3, 455-461. 11 ref.

(file fingerprinting.pdf)

Charters, Y. M. Robertson, A. Wilkinson, M. J. Ramsay, G

PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers.

Theoretical & Applied Genetics. 1996. 92: 3/4, 442-447. 15 ref.

(fotocopia)

Saeglitz, C. Pohl, M. Bartsch, D

Monitoring gene flow from transgenic sugar beet using cytoplasmic male-sterile bait plants. *Molecular Ecology*. 2000. 9: 12, 2035-2040. 27 ref.

(file male sterility2.pdf)

Chevre, A. M. Eber, F. Baranger, A. Kerlan, M. C. Barret, P. Festoc, G. Vallee, P. Renard, M Interspecific gene flow as a component of risk assessment for transgenic brassicas.

*Acta Horticulturae*. 1996. No. 407, 169-179. 13 ref

(fotocopia)

Wilkinson, M. J. Davenport, I. J. Charters, Y. M. Jones, A. E. Allainguillaume, J.

Butler, H. T. Mason, D. C. Raybould, A. F

A direct regional scale estimate of transgene movement from genetically modified oilseed rape to its wild progenitors

*Molecular Ecology*. 2000. 9: 7, 983-991. 35 ref.

(file mike.pdf)

Scott, S. E. Wilkinson, M. J

Transgene risk is low.

Nature (London). 1998. 393: 6683, 320. 7 ref

(fotocopia)

Chevre, A. M. Eber, F. Baranger, A. Renard, M

Gene flow from transgenic crops.

Nature (London). 1997. 389: 6654, 924. 6 ref.

(fotocopia)

D. Pessel (1), J. Lecomte (1), V. Emeriau (2), M. Krouti (3), A. Messean (2), P. H. Gouyon (1)

Persistence of oilseed rape (*Brassica napus* L.) outside of cultivated fields

Theoretical & Applied Genetics. 2001 102 6/7 pp 841-846

(file risk.pdf)

C. Lu , M. Kato , F. Kakihara

Destiny of a transgene escape from *Brassica napus* into *Brassica rapa*

Theoretical and Applied Genetics 2002 105: 78-84

(file escape.pdf)

K. Suwabe, H. Iketani, T. Nunome, T. Kage, M. Hirai

Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L.

Theoretical and Applied Genetics (2002) 104: 1092-1098

(file SSR and *Brassica rapa*.pdf)

J. Plieske, D. Struss:

Microsatellite markers for genome analysis in Brassica. I. development in Brassica napus and abundance in Brassicaceae species

Theor Appl Genet 102 (2001) 5, 689-694

(file SSR and Brassica.pdf)

B. Saal, J. Plieske, J. Hu, C. F. Quiros, D. Struss:

Microsatellite markers for genome analysis in Brassica. II. Assignment of rapeseed microsatellites to the A and C genomes and genetic mapping in Brassica oleracea L.

Theor Appl Genet 102 (2001) 5, 695-699

(file SSR and brassica2.pdf)

## REFERENCIAS

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.

## 10. Aspectos Administrativos

### 10.1. Organización previa a la actividad de formación

#### a. Conformación del grupo

\_\_\_\_\_ muy dificultosa     sin problemas    \_\_\_\_\_ algunas dificultades

(Indicar los motivos en caso de dificultades)

#### b. Apoyo de la Entidad Responsable

bueno                    \_\_\_\_\_ regular                    \_\_\_\_\_ malo

(Justificar)

#### c. Información recibida durante la actividad de formación

amplia y detallada    \_\_\_\_\_ aceptable                    \_\_\_\_\_ deficiente

#### d. Trámites de viaje (visa, pasajes, otros)

bueno                    \_\_\_\_\_ regular                    \_\_\_\_\_ malo

#### e. Recomendaciones (señalar aquellas recomendaciones que puedan aportar a mejorar los aspectos administrativos antes indicados)

## 10.2. Organización durante la actividad (indicar con cruces)

| Ítem                                    | Bueno | Regular | Malo |
|---|-------|---------|------|
| Recepción en país o región de destino   | x     |         |      |
| Transporte aeropuerto/hotel y viceversa | x     |         |      |
| Reserva en hoteles                      | x     |         |      |
| Cumplimiento del programa y horarios    | x     |         |      |

En caso de existir un ítem Malo o Regular, señalar los problemas enfrentados durante el desarrollo de la actividad de formación, la forma como fueron abordados y las sugerencias que puedan aportar a mejorar los aspectos organizacionales de las actividades de formación a futuro.

## 11. Conclusiones Finales

**12. Conclusiones Individuales:** anexar las conclusiones individuales de cada uno de los participantes de la actividad de formación, incluyendo el nivel de satisfacción de los objetivos personales (no más de 1 página y media por participante).

A través de este programa de formación se pudieron cumplir distintos objetivos como:

- 1) Incorporarse al programa de evaluación de flujo génico para Brassica mediante un grupo internacional que trabaja en bioseguridad;
- 2) Mejorar el conocimiento de algunas técnicas moleculares;
- 3) Participar en ensayos de campo para la selección de material a ser analizado tanto en laboratorio con Marcadores Moleculares como a través del servicio de Citometría de Flujo;
- 4) Realizar hibridación manual en invernaderos con plantas de *Brassica* sp..



5) Transferencia y aplicación del modelo Brassica utilizado en Inglaterra al sistema de evaluación y monitoreo chileno para Brassica, papa y maíz, en el marco del Proyecto FIA 01-A-014.

Se pudo, además, recopilar numerosos artículos científicos, enlazar contactos con investigadores internacionales y estudiantes de doctorados, y finalmente mejorar el conocimiento de la lengua Inglesa.

Puedo, concluyendo, expresar mi plena satisfacción con la realización de esta actividad de formación y agradecer la Fundación para la investigación Agraria por su apoyo financiero.

Saluda atentamente

Simona De Felice

Fecha: \_\_\_\_\_25 Noviembre 2002\_\_\_\_\_

Nombre y Firma coordinador de la ejecución: Simona De Felice

AÑO 2002