

materia

Bioteecnoloxía Vexetal

unidade didáctica 3

Transformación xenética de plantas

Francisco Luís de la Torre Noya e Antonio Segura Iglesias

Departamento de Fisioloxía Vexetal

Facultade de Bioloxía



VICERREITORÍA DE ESTUDANTES,
CULTURA E FORMACIÓN CONTINUA

titulación

Grao en Bioloxía



unidade didáctica 3

Transformación xenética de plantas

Francisco Luís de la Torre Noya e Antonio Segura Iglesias
Departamento de Fisioloxía Vexetal
Facultade de Bioloxía



Copyright © Universidade de Santiago de Compostela, 2012

Deseño

Unidixital

Edita

Vicerreitoría de Estudantes,
Cultura e Formación Continua
da Universidade de Santiago de Compostela
Servizo de Publicacións
da Universidade de Santiago de Compostela

Imprime

Unidixital

Servizo de Edición Dixital da
Universidade de Santiago de Compostela

Dep. Legal: C 1123-2012

ISBN 978-84-9887-904-9

ADVERTENCIA LEGAL: reservados todos os dereitos.
Queda prohibida a duplicación, total ou parcial desta
obra, en calquera forma ou por calquera medio (elec-
trónico, mecánico, gravación, fotocopia ou outros) sen
consentimento expreso por escrito dos editores.

MATERIA: Biotecnoloxía Vexetal

TITULACIÓN: Bioloxía

PROGRAMA XERAL DO CURSO

Localización da presente unidade didáctica

Unidade I. O cultivo *in vitro* de plantas

Biotecnoloxía: conceptos xerais.

Cultivo *in vitro*. Introducción ao cultivo *in vitro*.

Micropropagación.

Enraizamento e aclimatación. Plantas libres de virus.

Embrioxénese somática. Biorreactores, sementes artificiais.

Variación somacional. Obtención de plantas haploides.

Unidade II. Aplicacións do cultivo *in vitro* de plantas

Cultivos celulares. Suspensións. Metabolitos secundarios. Medios.

Cultivo de protoplastos. Rexeneración da parede celular.

Conservación do xermoplasma. Encapsulación e criopreservación.

Consideracións económicas das aplicacións do cultivo *in vitro*.

Unidade III. A transformación xenética de plantas

O xenoma das plantas. A tecnoloxía do ADN recombinante.

Enxeñaría xenética. Xenes marcadores e informadores. Selección.

Vector natural: *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes*.

Transferencia de xenes mediante biobalística.

Outros métodos de transformación xenética.

Rexeneración. Análises moleculares e fenotípicas.

Unidade IV. Aplicacións da enxeñaría xenética de plantas

Logros actuais da enxeñaría xenética.

Calidade dos produtos vexetais. Resistencias.

Bioseguridade.

A enxeñaría xenética e percepción social. Alimentos transxénicos.

Lexislación.

ÍNDICE

Presentación	7
Os obxectivos	8
A metodoloxía	9
Os contidos	9
1. Introducción a enxeñaría xenética vexetal	10
1.1. O xenoma das plantas	10
1.2. Modificación xenética dos cultivos vexetais	11
1.3. Xenos marcadores e informadores	11
2. Sistemas con vector natural: <i>Agrobacterium</i>	11
2.1. <i>Agrobacterium</i> como patóxeno natural	12
2.2. Transformación de plantas con <i>A.tumefaciens</i>	12
2.3. Transformación de plantas con <i>A. rhizogenes</i>	12
3. Biobalística	12
3.1. <i>Agrobacterium</i> como patóxeno natural	12
3.2. Transformación de plantas con <i>A.tumefaciens</i>	12
3.3. Transformación de plantas con <i>A. rhizogenes</i>	12
4. Outros métodos de transformación	14
5. Rexeneración e análise de plantas transxénicas	14
5.1. Rexeneración de plantas transxénicas	14
5.2. Análise molecular das plantas transxénicas	15
5.3. Análise fenotípica das plantas transxénicas	15
Avaliación	15
Bibliografía	17
Recursos en Internet	18

PRESENTACIÓN

A presente unidade didáctica, *A transformación xenética de plantas*, forma parte da Biotecnoloxía Vexetal, que trata da modificación dos vexetais de cara ao seu aproveitamento. Esta materia impártese no cuarto curso do Grao en Bioloxía, como unha optativa que se desenvolve no 2º semestre de titulacións de grao/máster. É unha materia ordinaria do grao (RD 1393/2007), que necesita un alto nivel de comprensión de materias anteriores, como Bioquímica I e II e Xenética I e II de segundo curso, as Fisioloxías Vexetais I e II de terceiro curso, e moi especialmente a Bioloxía Molecular, obrigatoria do primeiro semestre de cuarto curso.

Duración

A materia Biotecnoloxía Vexetal ten unha duración de 4.5 créditos ECTS (Sistema Europeo de Transferencia de Créditos), e contempla a realización de diversas prácticas de laboratorio. Nese contexto, esta unidade didáctica impartirase durante seis sesións expositivas de 50 minutos. Aspectos directamente relacionados con esta unidade impartiranse tamén durante a práctica da materia Biotecnoloxía Vexetal.

Destinatarios

O destinatario é o alumnado de cuarto curso do Grao en Bioloxía, que chegado este punto do currículo académico é de esperar que teñan coñecementos sobre materias como Fisioloxía Vexetal ou Xenética e Bioloxía Molecular, imprescindibles para un bo aproveitamento da materia. Así mesmo, cómpre a adquisición previa de capacidades do manexo no laboratorio de ciencias biomédicas e medidas básicas de seguridade.

Xustificación

Durante séculos, dende o inicio da agricultura, a humanidade fixo un gran esforzo no desenvolvemento de métodos que permitiron mellorar a calidade e a produción dos cultivos, tales como a hibridación e os cruzamentos selectivos. Se noutras áreas falamos de interese, no caso da biotecnoloxía vexetal debemos falar de necesidade, pois o sustento fundamental da alimentación sempre foi, e probablemente continúe a ser, a produción dos cultivos de plantas de interese comercial. Segundo todas as estimacións, a poboación humana medrará de forma significativa nas próximas décadas, mentres que a produción de alimentos de orixe vexetal se atopa nunha situación na que non cabe esperar achegas de novo solo ou melloras na produtividade por métodos tradicionais. Nese contexto, a transformación xenética aparece como unha ferramenta que se desenvolve para conseguir a suficiencia alimentaria da humanidade nun futuro próximo e para mellorar a produtividade económica e ambiental do sector agrícola.

En contraste coa mellora xenética tradicional, que se basea no cruzamento de centos ou miles de xenes, a Biotecnoloxía Vexetal permite a transferencia dun ou duns poucos xenes desexables. Esta tecnoloxía máis precisa proporciona aos melloradores vexetais as ferramentas para obter plantas de cultivo con caracteres desexables dunha forma máis rápida e controlada.

Hai, de calquera xeito, grandes retos que se deben asumir nos próximos anos, como a percepción social da transxénese, ou as dificultades e peculiaridades asociadas ás técnicas do cultivo *in vitro* e á enxeñaría

xenética en plantas. Ademais da formación científica, esta materia permitirá ao alumnado ter unha capacidade crítica e fundamentada para valorar a presenza continua de novas asociadas á problemática da transformación xenética de cultivos empregados como alimento.

De calquera xeito, a transformación xenética de plantas, entendida como o proceso que permite o estudo funcional dos xenes e a mellora molecular das plantas, presenta un notable interese para a formación de alumnos de Bioloxía e moi en particular para os futuros biotecnólogos vexetais.

OS OBXECTIVOS

Dentro da formación en Biotecnoloxía Vexetal, será necesario acadar uns obxectivos xerais **da materia**:

- Coñecer e manexar vocabulario específico da materia.
- Adquirir coñecementos avanzados sobre o cultivo *in vitro* e as súas aplicacións.
- Adquirir coñecementos avanzados sobre a enxeñaría xenética de plantas e as súas aplicacións.
- Valorar a importancia socioeconómica do impacto da biotecnoloxía vexetal sobre os cultivos, tanto historicamente como no futuro.
- Coñecer e utilizar as técnicas de laboratorio básicas empregadas nun laboratorio de biotecnoloxía vexetal.

Obxectivos específicos **da unidade didáctica A transformación xenética das plantas**:

- Adquirir coñecementos avanzados sobre os diferentes métodos de transformación xenética de plantas e as tecnoloxías asociadas.
- Adquirir coñecementos avanzados sobre o proceso de selección, rexeneración e avaliación de plantas transxénicas.
- Desenvolver capacidades de manexo das tecnoloxías necesarias para a transformación xenética de plantas no laboratorio de prácticas.

Estes obxectivos específicos contribuirán a acadar varios dos obxectivos xerais da materia, especialmente o primeiro, terceiro e quinto.

OS PRINCIPIOS METODOLÓXICOS

Para o desenvolvemento da unidade didáctica empregaranse 6 horas de clases expositivas en grupo pequeno (aproximadamente 20 alumnos). O desenvolvemento dos contidos será efectuado en clases expositivas, distribuídas do seguinte xeito:

- O xenoma das plantas. A tecnoloxía do ADN recombinante (1 hora).
- Enxeñaría xenética. Xenos marcadores e informadores (1 hora).
- Vector natural: *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes* (1 hora).
- Transferencia de xenos mediante biobalística (1 hora).
- Outros métodos de transformación xenética (1 hora).
- Rexeneración. Análises moleculares e fenotípicas (2 horas).

Para a exposición empregarase fundamentalmente o apoio da proxección de presentacións, con abundancia de fotografías e esquemas, correspondentes a exemplos de plásmidos, plantas transformadas e rexeneradas. Buscarase en todo momento a participación activa do alumno mediante a formulación de cuestións relativas ao tema en curso e a súa interrelación cos temas xa vistos.

En canto ás prácticas, faranse catro grupos de cinco ou seis alumnos. En todo momento serán os alumnos quen realicen o manexo do equipamento necesario, baixo a supervisión do profesor. A duración total da práctica será de seis horas, repartidas en tres sesións; a primeira e última dunha hora de duración e unha central de catro horas.

Calquera carencia ou peculiaridade detectada no alumnado durante as clases expositivas ou o desenvolvemento da práctica, abordarase nas horas de titorías da materia, recomendando reforzos concretos e proporcionando bibliografía axeitada.

OS CONTIDOS

A transformación xenética de plantas, unha realidade desde o ano 1983, está cada vez máis presente tanto nas publicacións científicas como para o público en xeral, debido fundamentalmente ao impacto dos alimentos transxénicos na opinión pública. De calquera xeito, é unha tecnoloxía complexa que permite abordar tanto a mellora molecular de determinados cultivos de interese, como un estudo funcional da inxente cantidade de información proporcionada polos estudos xenómicos. Para a bioloxía molecular, a transformación é a alteración xenética que resulta da toma, incorporación e expresión de novo material xenético do medio. Aínda que este proceso pode ocorrer naturalmente, sobre todo en bacterias, pode ser efectuado de xeito artificial.

1. Introducción á enxeñaría xenética vexetal

A enxeñaría xenética permite modificar as características das plantas de interese comercial. A nosa capacidade para transformar o xenoma das plantas naceu da conxunción dos avances en cultivo in vitro de plantas coa descuberta da tecnoloxía do ADN recombinante durante a última metade do século XX. En conxunto, estas tecnoloxías permiten:

- Mellorar a produtividade, aumentando a capacidade produtiva potencial dos individuos.
- Mellorar a resistencia a patóxenos, pragas e condicións ambientais adversas.
- Mellorar as características agronómicas, mediante a aparición de novos xenotipos máis adaptados ou con novas características desexables.

Na **Figura 1** móstrase un resumo dos procesos implicados na obtención dunha planta transxénica para a súa posterior avaliación molecular e fenotípica.

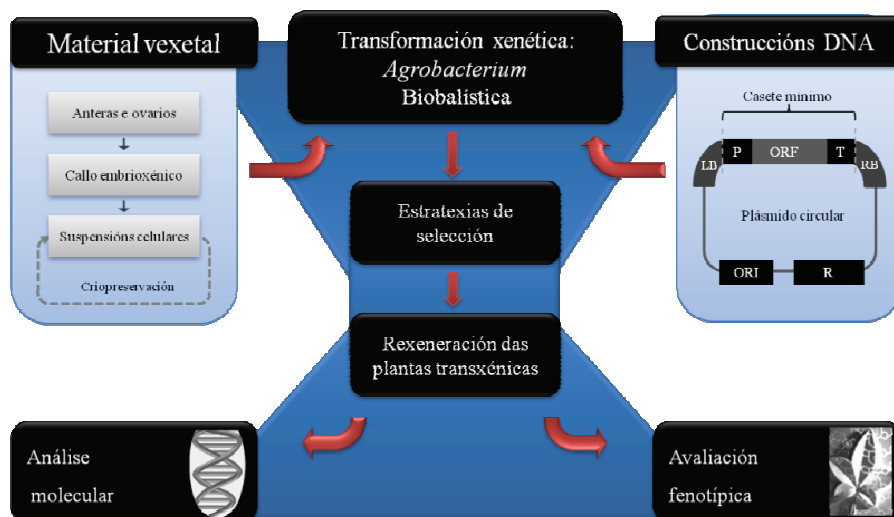


Figura 1. O proceso de obtención e análise de plantas transxénicas.

1.1. O xenoma das plantas

Os xenomas dos organismos vexetais presentan características intrigantes: o rango da súa variación en tamaño (usualmente medida segundo o valor C, ou cantidade de ADN nas células haploides) é enorme, e non hai correlación coa complexidade do organismo. Por exemplo, *Arabidopsis thaliana*, a planta modelo da xenética e da fisioloxía vexetal, ten un valor C de 125 Mb, mentres un organismo dunha complexidade semellante como *Fritillaria assyriaca* presenta un valor C 1000 veces superior (paradoxo do

valor C). Esta enorme variación está relacionada cos niveis de ploidía (número completo de xogos cromosómicos), moi variable nas plantas. Outro factor clave e de gran interese son os fenómenos de duplicación xénica, ou a presenza de gran número de elementos xenéticos móbiles como os transposóns. Estes últimos non só teñen que ver co incremento do tamaño do xenoma, senón que afecta a outros xenes, rompendo e creando novas funcións e redes reguladoras.

1.2. Modificación xenética dos cultivos vexetais

Aínda que tradicionalmente se foron modificando os xenotipos dos cultivos desde a descuberta da agricultura mediante selección artificial e hibridacións, este proceso é lento e leva asociada una certa falta de control no resultado. Coas técnicas de enxeñaría xenética e os métodos de transformación dispoñibles na actualidade, é posible modificar xeneticamente as plantas de interese comercial dun xeito máis controlado. O material xenético que se introducirá no organismo diana pode ser heterólogo, procedente doutro organismo, ou homólogo, empregando un xene da propia especie con secuencias reguladoras que provoquen a súa expresión en condicións diferentes. Do mesmo xeito, a natureza dos xenes introducidos pode ser variable; encimas de distintas rutas biosintéticas, factores de transcrición, proteínas relacionadas coa resistencia a pragas e patóxenos, e incluso xenes en antisentido co obxecto de anular a expresión de determinados xenes endóxenos.

1.3. Xenes marcadores e informadores



Os xenes marcadores son xeralmente aqueles que nos permiten seleccionar despois do proceso de transformación xenética, conferindo normalmente resistencia a antibióticos. Os xenes informadores, pola contra, non permiten a selección pero empréganse como un modo efectivo de levar un seguimento do éxito da transformación: usualmente confiren unha cor diferenciada ou fluorescencia. Existe un crecente abanico de posibilidades para o uso de ambos tipos de xenes, desde os máis empregados como o *NPTII* que confire resistencia a

antibióticos aminoglucósidos, ou o xene *uidA* (β -glucuronidasa) que cun substrato comercial desenvolve unha característica cor azul para localizar o tecido transformado.

2. Sistemas con vector natural: *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes*

Dentro dos métodos de transformación xenética de plantas, hainos biolóxicos e físicos. Os biolóxicos fan uso de organismos que son capaces de transferir fragmentos de ADN a células vexetais.

2.1. *Agrobacterium* como patóxeno natural

Agrobacterium é un xénero de bacterias que causan tumoracións nas plantas, grazas á súa capacidade para transformar células vexetais de xeito natural no seu propio beneficio. A bacteria introduce un fragmento de DNA do seu plásmido Ti, chamado T-DNA, que porta xenes capaces de alterar o metabolismo da planta no seu propio beneficio, obrigandoo hóspede a fabricar uns aminoácidos especiais (opinas) que a bacteria pode metabolizar. Este proceso está naturalmente controlado polos chamados xenes VIR.

2.2. Transformación xenética de plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Este sistema biolóxico natural é a base dun método de transformación no que se usa esta bacteria para a transmisión de material xenético de xeito controlado, retirando o T-DNA da bacteria e cambiándoo por un fragmento de interese. O rango de posibles organismos dianas é bastante amplo, incluíndo dicotiledóneas e monocotiledóneas. Para mellorar a eficiencia, nas últimas décadas realizáronse grandes avances na optimización do proceso de transformación, empregando indutores como acetosiringona, e tamén na obtención de novos plásmidos binarios nos que o T-DNA está situado nun plásmido pequeno independente do Ti. Así mesmo, introducíronse cepas con xenes VIR hipervirulentos, como as EHA101 ou EHA105, coas que se conseguiu transformar arroz e trigo.



2.3. Transformación xenética de plantas mediante *Agrobacterium rhizogenes*

O mecanismo polo que *A. rhizogenes* transforma naturalmente as plantas susceptibles é moi semellante, pero coa diferenza de que provoca a aparición de raíces “pilosas” transxénicas, un fenotipo moi desexable para a produción comercial de certos metabolitos secundarios.

3. Biobalística

A biobalística é un método físico de transformación. Baséase no uso de microproyectís, xeralmente de metais inertes, que se rodean de ADN para seren posteriormente bombardeados sobre o tecido diana, que pode ser de diversa procedencia: suspensións celulares, explantos de cultivo *in vitro* ou incluso follas ou outros órganos vexetais procedentes do campo.

3.1. Características do sistema biobalístico

No sistema biobalístico, partículas de ouro ou tungsteno tapízanse co fragmento de ADN de interese. Ao contrario que no caso de *Agrobacterium*, os vectores poden ser de moi pequeno tamaño ou incluso fragmentos lineais de ADN que tan só porten promotor-ORF-terminador (tecnoloxía do casete mínimo). O tapizado lévase a cabo de forma moi controlada, normalmente na presenza de CaCl_2 e a unha poliamina como a espermidina, creando así un contorno fisicoquímico no que o ADN tende a unirse aos microproyectís.



Posteriormente, estes microproyectís recubertos de ADN aceléranse nun dispositivo, normalmente empregando o He presurizado, como ocorre no Biolistic-PDS 1000/He comercializado por Bio-Rad. Os microproyectís dispáranse sobre o tecido diana, usualmente non penetrando máis alá de dúas células de espesor. O compromiso entre a aceleración necesaria para que as partículas penetren a través da parede celular, pero non fagan un dano excesivo á célula, é determinante para o éxito desta técnica.

3.2. Aplicacións da biobalística

Este método presenta unha serie de vantaxes sobre o método biolóxico. Dentro delas están algunhas aplicacións interesantes desde o punto de vista biotecnolóxico, como poden ser:

- É unha técnica que se pode empregar virtualmente sobre calquera tecido diana.
- A enxeñaría de variedades de enorme importancia comercial está restrinxida empregando outros métodos.
- Permite estudos rápidos de transformación transitoria para a análise de secuencias reguladoras.
- É a única técnica dispoñible para a transformación xenética de orgánulos (cloroplastos).

3.3. Biobalística versus *Agrobacterium*

Aínda que o rango de especies que é posible transformar mediante *Agrobacterium* é bastante amplo, existe un gran número de especies de grande importancia comercial que permanecen recalcitrantes á transformación biolóxica. A biobalística, porén, pode empregarse, en principio, sobre calquera tipo de organismo. Impide, ademais, os falsos positivos asociados á expresión de xenes informadores da propia bacteria. Outra vantaxe é que ao non empregar a bacteria, evítanse reaccións de

hipersensibilidade que moitas veces comprometen a capacidade do tecido para a posterior rexeneración; ademais non é necesario o emprego de antibióticos para eliminar á bacteria, que poden presentar un certo grao de toxicidade.

4. Outros métodos de transformación

Ademais do método biolóxico empregando *Agrobacterium* e da biobalística, existen outros moitos métodos que foron empregados con éxito en plantas.

Microinxección: Aínda que se empregou máis extensivamente en tecidos animais, tamén é funcional para tecidos vexetais. Non obstante, pola propia estrutura das células e tecidos vexetais, é complexo obter unha adecuada microinxección. Por exemplo, o feito de presentar parede e turxescencia fai case imposible que a membrana celular forme unha barreira eficaz cando a punta da xiringa se introduce na célula. De todos os xeitos, conseguiuase por este método a transformación con éxito tanto de células vexetais como de protoplastos.

Electroporación: A electroporación é un método no que se aplican correntes eléctricas que causan algún tipo de cambios e unha reordenación na membrana celular, permitindo a entrada de macromoléculas como o ADN. Ata non hai moito, este método só funcionaba con protoplastos, pero cambiando os pre-tratamentos conseguiuase transformar tamén células con parede. O éxito da electroporación baseábase fundamentalmente nun pre-tratamento complexo das células. Porén, células dalgunhas especies de importancia comercial como o millo son fáciles de transformar con este método.

Existen outros métodos para transformar xenéticamente células vexetais, que inclúen a agroinfiltración ou macroinxección (infiltración dos tecidos con *Agrobacterium*), o cocultivo de *Agrobacterium* con órganos florais (*floral dip*), a transformación de protoplastos con polietilenglicol (PEG), etc. Cada un deles presenta unhas aplicacións determinadas con unha serie de vantaxes e problemas que dependerán de moitos factores.

5. Rexeneración e análise de plantas transxénicas

Unha vez acadada con éxito a transformación xenética, e dependendo do obxectivo marcado, poderá ser necesario rexenerar plantas a partir do tecido transformado. Este é o caso, sen dúbida, cando o que precisemos sexa conseguir plantas melloradas ou para estudos fisiolóxicos. Unicamente en estudos de eficiencia de secuencias reguladoras adóitase omitir este paso, dado que se considera que a transformación transitoria (aquela que non depende da integración do transxén no cromosoma vexetal) pode ser suficiente.

5.1. Rexeneración de plantas transxénicas

A selección e rexeneración de plantas é, en moitos casos, a etapa máis complicada e certamente limitante nos procesos de obtención de plantas transxénicas. En primeiro lugar débese dispor dun método de selección adecuado, xa que por norma os eventos de transformación estable só ocorrerán nunha pequena proporción das células. Con este fin adóitase cultivar o tecido transformado en presenza de antibióticos como a kanamicina ou a higromicina, de tal xeito que só poidan crecer e reproducirse as células transformadas que porten os xenes marcadores. A selección adoita presentar certos escapes polo cal tan só serve como unha primeira criba.

5.2. Análise molecular das plantas transxénicas

As plántulas que superaron o proceso de selección adoitan ser analizadas en primeira instancia por PCR estándar, empregando cebadores do transxén de interese para determinar a súa presenza. As positivas analizaranse posteriormente con técnicas que nos permitirán coñecer se ocorreu inserción do transxén no cromosoma vexetal, a súa posición, número de copias, e incluso a localización do RNA ou da proteína, así como os niveis de expresión do transxén. Para isto, pódense empregar técnicas como o *southern blot*, a PCR en tempo real, *northern blot*, *western blot*, hibridación *in situ* e outras.

5.3. Análise fenotípica das plantas transxénicas

Tras a etapa de selección e a caracterización molecular das plantas transxénicas, e dependendo do xene de interese, as liñas resultantes analizaranse en función do carácter inserido. A duración deste proceso é altamente variable, dependendo das análises que se realicen, e sobre todo, de se a especie vexetal é de ciclo curto ou non. Normalmente levarase a cabo en cámaras ou invernadoiros que cumpran a normativa para a manipulación de organismos transxénicos.

AVALIACIÓN DA UNIDADE DIDÁCTICA

- Na primeira clase expositiva as preguntas iniciais estarán orientadas a establecer unha avaliación dos coñecementos dos alumnos en canto a enxeñería xenética de plantas.
- Durante o desenvolvemento das clases expositivas realizaranse cuestións para avaliar a comprensión por parte do alumnado, tanto dos aspectos máis conceptuais como dos puramente metodolóxicos.
- Durante a parte correspondente a esta unidade didáctica da práctica de Biotecnoloxía, comprobarase ocularmente e mediante cuestións

orais a capacidade dos alumnos no manexo de técnicas de laboratorio e do vocabulario específico da materia.

- A avaliación final fundamentarase sobretudo no exame que se levará a cabo ao remate da materia de Biotecnoloxía, onde haberá unha parte importante relacionada con esta unidade didáctica. Neste exame avaliaranse os coñecementos adquiridos, facendo especial fincapé na capacidade do alumno para relacionar os contidos desta unidade didáctica co resto da materia e cos coñecementos previos da materia de Bioloxía Molecular do cuarto curso do Grao en Bioloxía.

BIBLIOGRAFÍA

- ASHWANI K. (2010): *Plant genetic transformation & molecular markers*. Jaipur: Pointer Publishers.
- CHITTARANJAN K, C. MICHLER, A.G. ABBOT e T.C. HALLK. (2010): *Transgenic crop plants*. Berlín: Springer-Verlag.
- DODDS, J. e L.W. ROBERTS (1995): *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge: Cambridge University Press.
- GAMBORG, O.L. e G.C. PHILLIPS (1995): *Plant cell, tissue and organ culture. Fundamental methods*. Berlín: Springer-Verlag.
- ROUBELAKIS-ANGELAKIS K.A. (2009): *Grapevine molecular physiology & biotechnology*. Berlín: Springer-Verlag.
- STEWART C.N, A. TOURAEV, V. CITOVSKY e T. TZFIRA (2011): *Plant transformation technologies*. Chichester: Wiley-Blackwell.
- THIEMAN W.J. e M.A. PALLADINO (2010): *Introducción a la biotecnología*. Madrid: Pearson Educación.
- TRIGIANO, R.N. e D.J. GRAY (1996): *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. Boca Ratón: CRC Press.

Citas de recursos en internet

Plant DNA C-values Database:

<http://data.kew.org/cvalues> [citado 20feb 2012]

Protocolos:

<http://www.protocol-online.org>[citado 20 feb 2012]

Fundación Antama:

<http://fundacion-antama.org>[citado 20 feb 2012]

International Service for the Adquisition of Agri-Biotech Applications:

<http://www.isaaa.org/default.asp>[citado 20 feb 2012]



Unha colección orientada a editar materiais docentes de calidade e pensada para apoiar o traballo do profesorado e do alumnado de todas as materias e titulacións da universidade



Impreso en papel 100% reciclado e libre de cloro



SERVIZO DE NORMALIZACIÓN LINGÜÍSTICA

