



Protocolo de detección de eventos J101/J163 tolerante a glifosato en poblaciones de alfalfa

Pablo Sipowicz, Valeria Moreno, Valeria Arolfo, Daniel Basigalup, Ariel Odorizzi

Las alfalfas tolerantes a glifosato (con tecnología RR, Roundup Ready®) como consecuencias de los eventos J101 y/o J163 están autorizadas para el cultivo en varios países. Actualmente en Argentina, solamente se encuentran autorizadas las alfalfas desarrolladas mediante ingeniería genética con lignina reducida (HarvXtra®) + el evento J101 que le aporta tolerancia a glifosato. Se presenta un protocolo de detección dirigido a detectar la secuencia de unión del genoma de la alfalfa y el inserto transgénico de el/los eventos que aportan tolerancia a glifosato.

El protocolo descrito a continuación enunciará los pasos a seguir en tres escenarios posibles:

- 1) Población con nula presencia de eventos transgénicos
- 2) Población con baja contaminación con plantas RR
- 3) Población con moderada/elevada contaminación con plantas RR

En los tres escenarios planteados se comienza con una etapa de cribado general, el cual permite determinar el nivel de contaminación. Se sugiere trabajar con poblaciones de entre 200 y 250 plantas para poder descartar grupos de plantas, sin tener que realizar el diagnóstico a nivel de planta individual.

Etapa de preparación de poblaciones:

Se sugiere que las plantas se siembren individualmente en maceta. Debe controlarse que efectivamente haya una planta por maceta. La maceta se debe identificar con un rotulo indicando el número de planta y la población a la que pertenece.

De no poder evitarse la siembra de múltiples semillas por maceta se debe ralea dejando una sola planta por maceta.

Etapa 1: Cribado

- 1) Se sugiere dividir a la población en 3 o 4 grupos dependiendo del número de individuos. Cada grupo se denomina Bulk seguido de un número de identificación. Por ejemplo, si se realizan 3 grupos de 70 individuos en una población de 210 se realizarán 3 Bulks: Bulk-1, Bulk-2 y Bulk-3.





- 2) Rotular un sobre lo suficientemente grande para contener 70 a 100 hojas trifolioladas con el nombre del Bulk y entre paréntesis indicar los números de plantas inicial y final del grupo. Por ejemplo: el Bulk-1 contendrá a las plantas del 1 al 70 por lo que el sobre se rotulará Bulk-1 (1 a 70).
Esto se realiza para que el operario que toma la muestra de cada planta individual pueda fácilmente identificar las plantas a muestrear.
- 3) Muestrear una hoja compuesta en buenas condiciones de sanidad y desarrollo, de cada individuo del Bulk y se la coloca dentro del sobre.
- 4) Determinar el peso neto de todas las muestras del Bulk.
 - 4a) Para ello se pesa un sobre vacío y se tara la balanza.
 - 4b) Luego se quita el sobre vacío y se pesa el sobre conteniendo todas las muestras del Bulk.
 - 4c) El valor de peso en gramos se anota en el sobre.
- 5) Preparar el molinillo asegurando que no queden restos de un diagnóstico anterior. Lavar con agua, secar con papel, lavar con alcohol y volver a secar con papel. No se recomienda limpiar el molinillo con algodón a fin de evitar contaminación con ADN extraño.
- 6) Vaciar el contenido del sobre en un molinillo de café.
- 7) Añadir 20 veces el valor del peso neto de muestra en ml de agua destilada. Por ejemplo, si la muestra pesa 1,5 gramos entonces se debe añadir 30 ml de agua destilada. Esto permitirá obtener una muestra que sea 5% p/v.
- 8) Colocar en la parte superior del receptáculo del molinillo un film plástico, que se descartara entre muestras, sujeto con banda elástica para evitar que la muestra salpique y se pierda.
- 9) Moler en pulsos hasta obtener todas las hojas de la muestra molidas.
- 10) Verter la muestra molida en un vaso de precipitado y dejar reposar unos segundos.
- 11) Trasvasar 2 ml de la muestra molida a un tubo falcon de 15 ml.
- 12) Insertar una tira reactiva y cronometrar. La tira no debe permanecer más de 5 minutos en la solución. De exceder los 5 minutos se puede incurrir en un falso positivo.
- 13) Pasados los 4-5 minutos extraer la tira de la solución y cortar los extremos desde las regiones con algodón para evitar que la tira siga reaccionando.
- 14) Anotar el resultado en el sobre de la muestra. Una banda (superior) significa negativo y dos bandas indican resultado positivo.

Etapa 2: Confirmación de diagnóstico y separación de plantas negativas para presencia de evento transgénico.

Esta etapa se realizara dependiendo de los resultados del cribado inicial:

Escenario A.

Ninguna de las tiras reactivas da resultado positivo, se considera que la **población no presenta contaminación** con plantas transgénicas portadoras de J101/J163.





Se vuelve a repetir el cribado con 50-70 plantas por grupo dependiendo de la cantidad de individuos en la población y la disponibilidad de tiras reactivas. Se realizan los mismos pasos que los descritos en la etapa de cribado y si todas las tiras dan resultado negativo se considera a la población libre de transgénicos y se separa el total de la población para su uso en policruzamientos, ensayos de selección u otros usos. Se repite la importancia de chequear que cada maceta contenga una sola planta.

Escenario B.

Del 33 al 50% de las tiras da positivo para presencia de plantas transgénicas. En este caso se sugiere disminuir el número de individuos por Bulk y realizar mayor cantidad de Bulks en una segunda etapa de determinaciones. Por ejemplo, en una población de 210 individuos se pueden realizar en la segunda etapa 14 Bulks de 15 individuos o 10 Bulks de 20 individuos dejando a 10 individuos fuera del análisis. El número de Bulks depende de la disponibilidad de tiras y de la contaminación: a mayor contaminación se sugiere disminuir la cantidad de individuos por Bulk. Se repite la operación descrita anteriormente en la etapa de cribado pero ahora con mayor número de Bulks. Aquellos Bulks que den negativo se consideran libre de transgénicos y se separan las plantas que lo componen para su posterior trasplante. Se debe prestar especial atención a que los resultados de la segunda etapa sean coherentes con los del cribado. Por ejemplo, si en el cribado inicial el primer Bulk (plantas 1 a 70) dio negativo y luego, en la segunda etapa, el segundo Bulk da positivo (plantas 16 a 30) ello indicaría que pudo ocurrir un error de muestreo y se debe realizar el diagnóstico nuevamente.

Escenario C.

Todas las tiras reactivas en el cribado dan positivo. En este caso se sugiere dividir a la población en bulks conteniendo 10 individuos. Se realiza el muestreo como se ha descrito en el cribado y luego el sobre conteniendo la muestra del Bulk se procesa para luego realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Procesamiento de muestra para PCR:

Metodología

Muestreo de plantas: se realiza el muestreo de cada Bulk (10 plantas) mediante el corte de una hoja de cada planta del Bulk, por lo que se recolectan 10 hojas/Bulk. A su vez, para minimizar el error durante el muestreo, un segundo operario realiza el muestreo por duplicado del Bulk. A cada muestreo se le asigna un número o letra con lo cual, por ejemplo, el primer muestreo del Bulk 1 se denomina B1.A, mientras que el segundo muestreo se denomina B1.B. Para solucionar el problema que plantea el distinto tamaño de las hojas, se realizan en cada hoja individual cortes de dos discos de 7 mm de diámetro con un sacabocados, lo que asegura una cantidad idéntica de material verde por cada individuo dentro del Bulk. Se obtienen entonces 20 discos por muestreo de cada Bulk. Los discos se colocan en sobres de papel y se incuban a 60°C durante 24hs para deshidratar el material verde y así acondicionarlo para la posterior extracción de ADN.



Extracción de ADN: las muestras deshidratadas se colocan en tubos de 2 ml junto a bolas abrasivas de tungsteno y se sacuden durante 1 minuto para destruir el tejido y exponer las células vegetales a la extracción de ADN. En un paso inicial se realiza un lavado con sorbitol para eliminar polisacáridos y elementos no deseados de la muestra. Se descarta el sobrenadante. Seguidamente, se realiza la extracción de ADN según el protocolo descrito por Inglis *et al.* (2016). Para evitar un exceso de ADN en las muestras se cuantifica la concentración de ADN obtenida en cada extracción y luego todas las muestras se diluyen a una concentración aproximada de 20 ng/ul. Este paso es muy importante dado que un exceso de ADN puede secuestrar a los cebadores e inhibir así la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aumentando por ende la probabilidad de obtener un falso negativo.

PCR: la construcción genética presente en cultivares tolerantes al herbicida glifosato de amonio (alfalfas RR) que derivan de los eventos J101 y J163 está constituida por dos copias del promotor FMV, el gen EPSPS y el terminador EP9. La PCR permite amplificar, a partir de una muestra de ADN, un determinado segmento de la construcción mencionada anteriormente utilizando los cebadores CP1/pFMV2. La visualización del producto de amplificación se realiza por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2%.

Las condiciones de la PCR son las siguientes:

- Componentes químicos de la reacción: 1x *Buffer* PCR, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 μM de cada cebador, 0,5 u/ul de Taq Pegasus, 40 ng de ADN genómico.
- Ciclos: 94°C 5 min; (94°C 40 s, 70°C 30 s, 72°C 45 s) x 40; 72°C 10 min.
- Número de réplicas: 2 para cada muestreo (4 réplicas por Bulk).

Los insumos utilizados en el protocolo son en su mayoría importados y requieren ser pedidos con una antelación mayor a 60-90 días.

Para el testeo de presencia de estos eventos en semillas de alfalfa se sigue el protocolo de Laboratorios Romers, 2013. "AgraStrip® RUR-HS Bulk Grain Strip Test – Qualitative Method" ©2013 Romer Labs®, Inc.



Paso 1. Preparación de población a muestrear. Se sugiere que las plantas se siembren individualmente en maceta. Debe controlarse que efectivamente haya una planta por maceta. La maceta se debe identificar con un rótulo indicando el número de planta y la población a la que pertenece. De no poder evitarse la siembra de múltiples semillas por maceta se debe ralea dejando una sola planta por maceta



Paso 2. Rotular sobres con el nombre del Bulk y la repetición. En la imagen se muestra la primera repetición del Bulk 1.



Paso 3. Cortar una hoja de cada planta perteneciente al Bulk. Como ejemplo en la imagen se trabaja con Bulks de 10 plantas individuales.



Paso 4. Pesar un sobre vacío.



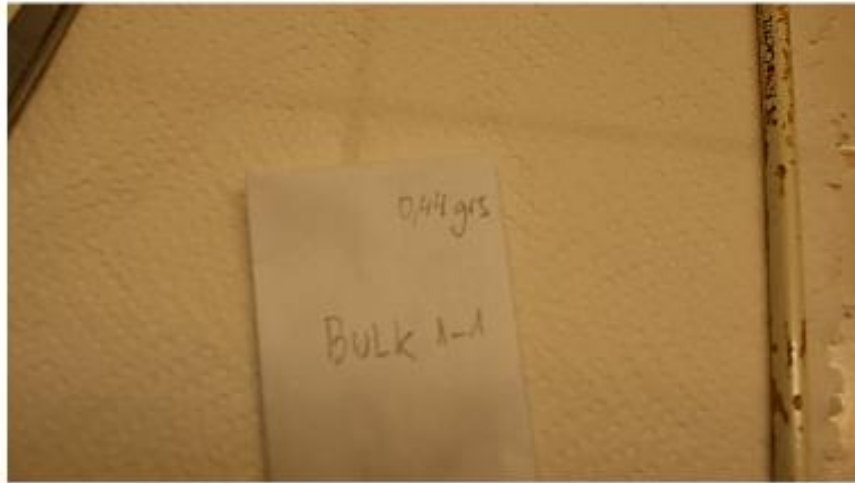
Paso 5. Tarar la balanza con el peso de un sobre vacío.



Paso 6. Introducir todas las hojas del Bulk en el correspondiente sobre etiquetado.



Paso 7. Pesar el sobre conteniendo las hojas muestreadas del Bulk. Este peso será el peso neto de las hojas.



Paso 8. Anotar en cada sobre el peso neto de las hojas.



Paso 9. Preparar el molinillo asegurando que no queden restos de un diagnóstico anterior. No se recomienda limpiar el molinillo con algodón. Limpiar con agua, papel, alcohol y papel, en ese orden.



Paso 10. Colocar las hojas en el molinillo



Paso 11. Agregar agua destilada al molinillo. Debe agregarse 20 veces (en ml) el valor del peso neto en gramos de las hojas



Paso 12. Como se coloca agua en el molinillo es preferible cubrir la boca del molinillo con un film plástico sujetado con banda elástica. En cada muestra se debe cambiar el plástico utilizado.



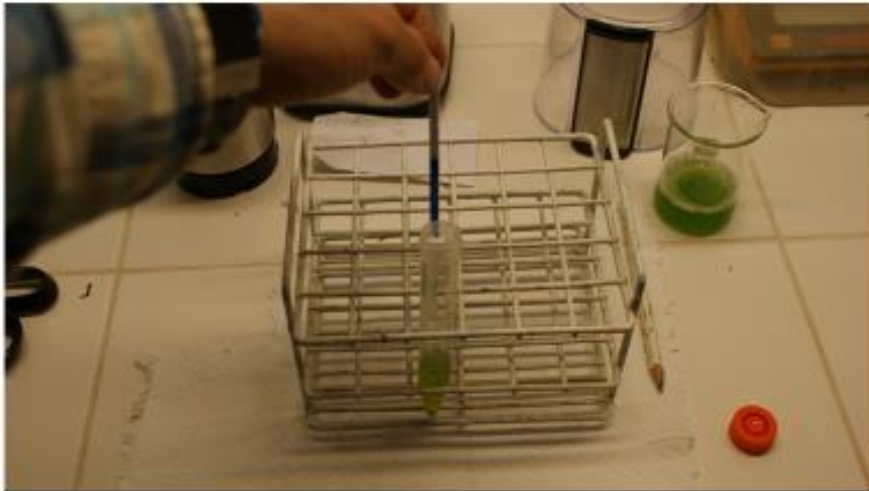
Paso 13. Moler la muestra en pulsos para lograr una correcta molienda de todas las hojas.



Paso 14. Verter la muestra molida en un vaso de precipitado y dejar reposar unos segundos.



Paso 15. Verter 2 a 2,5 ml de la muestra en un tubo falcon de 15 ml.



Paso 16. Introducir una tira reactiva en la muestra molida e iniciar el timer.



Paso 17. Esperar la aparición de reacción en las zonas de testeo y control. La tira no debe permanecer en la solución por más de 5 minutos.



Paso 18. Extraer la tira reactiva de la muestra y cortar la tira en ambos extremos a la altura de las flechas para inhibir que la tira pueda seguir reaccionando. La aparición de una sola banda en el extremo superior indicará un resultado negativo (como se observa en la foto). La aparición de dos bandas indica un resultado positivo.



Paso 19. Rotular en el sobre de la muestra el resultado obtenido y continuar con la próxima muestra.