LGMM Laboratorio de Genómica y Marcadores Moleculares

UBATEC

URUPOV SEMILLA LEGAL

USO DE MARCADORES MOLECULARES EN SOJA:
UNA HERRAMIENTA PARA LA DEFENSA DE LOS DERECHOS DE OBTENTOR

Natalia Ibna[1], Silvina Morris[1], Josefina Demichelis[1], Eduardo A. Pagano[1], Marcelo Soria[1], Victoria Stewart[2], Diego Rossi[3], Miguel Rapela[3]

1 - LGMM (Laboratorio de Genómica y Marcadores Moleculares, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires)
2 - URUPOV (Asociación Civil Uruguaya para la Protección de los Obtentores Vegetales)
3 - UBATEC

1 INTRODUCCIÓN

URUPOV nace como una agencia privada, sin fines de lucro, formada por los principales obtentores de variedades vegetales del Uruguay.
Uno de los cometidos de URUPOV es velar por los derechos de propiedad intelectual de sus socios, cuidando de la calidad de la información del mercado semillero.
Para monitorear la eficacia de sus marcas, URUPOV encuentra una serie de herramientas que le dan la identificación de posición única a variedades.

Superficie sembrada de soja (Ciclo origen 2020 - Ciclo 2021)

	Área Cultivar	Porcentaje
Semilla almacenada	274 000	44%
Semilla comprada	609 000	55%
Total legal	1 027 000	99%
Semilla ilegal + No ID?	10 000	1%
TOTAL	1 100 000	100%

Área de soja para grano almacenada = 1.0%

El uso de marcadores moleculares para identificación de variedades de soja por ADN es la vanguardia de las herramientas más eficaces para la observancia de los derechos.

UBATEC es una organización sin fines de lucro de la Universidad de Buenos Aires, y la Confederación General de la Industria, para la promoción y fomento de la transferencia de tecnología, siendo uno de los principales ejes de innovación y transferencia tecnológica de la Argentina.

2 OBJETIVOS DEL PROYECTO UBATEC - URUPOV

- Definir set de 12 marcadores moleculares y protocolo a utilizar
- Definir la matriz de referencia con las variedades de soja sembradas en Uruguay
- Validar la técnica y la precisión de sus resultados
- Mantener actualizada la matriz con nuevas bajantes más de variedades
- Proveer y asesorar en otras inquietudes de soja: semilla y grano de plantas

Los 12 marcadores utilizados son la elección entre del BeNCSy INRAE (Dupplier-Soaj diseñados por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) y cada uno diferencia por resultado del SAGP Argentina. Para SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) permiten diferenciar las variedades de soja utilizando comparaciones fuertes (con siete en los dos siguientes, por ejemplo CT vs. TT) al 99,9% de fiscales. El procedimiento se realiza a través de PCRs con 12 marcadores SAGP (Competitive Allele Specific PCR) utilizando la plataforma SNP Line (LGC Biosearch Technologies).

3 METODOLOGÍA

URUPOV cuenta 74 muestras de variedades de soja sembradas en Uruguay para su tabulación, que, a medida que se comparten con digital, se **logra obtener la matriz con los perfiles de las variedades que representan el 100% del mercado uruguayo**.

La tecnología fue testeada y validada a través del mercado en variedades comerciales por parte de URUPOV, obteniendo resultados con una precisión mayor al 99%.

URUPOV recorre muestras en el sitio de la soja sembrada y en grano cosechada en destino a su compra. Se acreditan y se envían a laboratorio de UBATEC para su identificación varietal.

Paso a paso:

- Definir muestra representativa de donde se extraerán las muestras a ensayar.
- Para los casos de ensayos a campo: tomar 5 muestras diferentes, tomando las coordenadas.
- En el muestreo de cortes (ciclo 1/2) y 2 (recolección) de hasta de plantas individuales.
- Las muestras son guardadas y enviadas en sobres (grano) o cortes de tejos alternativos.
- Para la toma de muestras a nivel de semilla recomendar tomar muestras de 1 kilo, se procesan en quinteto, se mezcla en cada muestra y se acondicionan en tamaños para su venta.
- Recibir muestras para ADN.

A comienzos del año 2021 se logra obtener la Matriz de referencia varietal que logra identificar las variedades del Uruguay.

Se hace el primer envío masivo con muestras de semilla "problema" en Julio y octubre de 2021.
Una vez que llegan a acceso en base al laboratorio del personal técnico verifica.

- Que las muestras recuperadas sean las enviadas por el productor.
- Se diseña un mapa de muestras en donde se referencia cada una a su plano y perfil específico.
- Se toma una submuestra de apoyo, 100g de la semilla proveniente.
- Se realizan cálculos de isolectros de laboratorio y particular de ADN total.
- Se pesa 1 g de la muestra y se triturar en nitrógeno líquido para obtener ADN de la placa de 96 pozos preparada.
- Se extrae el ADN a través del kit Nucleospin plant II (Macherey-Nagel Inc. Bethlehem, USA).
- Se realizan el ensayo a través de PCRs utilizando la metodología SAGP.
- El ADN consiste almacenado en placas de 384 pozos y se replica en placas de 1536 pozos, según el requerimiento.
- Se dispone la placa con reactivos (en vasos a través del Mini Robot™) y las placas se refrigeran en las equipos Roboy™ y Lunaxo™ de la UBATEC.
- Se realiza la PCR en cada una, mezclar en el termociclador Hydrocycler™ y la fluorescencia se digitaliza a través del "MAGNetic".
- Se visualiza gráficamente los resultados.

La variabilidad entre las muestras del productor se genera en el momento del cultivo de la semilla, y que en Kaiser™. Una vez que se cuenta con la asignación alélica de cada muestra se exporta en los datos de una software y se importa a R, en donde se asigna la variedad más probable comparando la muestra con una base de referencia a través del cálculo de la distancia de Hamming.

4 RESULTADOS

Una vez que UBATEC entrega a URUPOV los resultados con las variedades identificadas por cada muestra, se comparan con la variedad declarada por el productor.

	MUESTRAS ENVIADAS DE SOJA (N°)			
	Coincidencia	Con diferencia	Total	%
	0	1		
N° Muestras	470	10	471	66,4%
N° Productores	238	10	239	100%
Volumen (Ton)	25 000	2 000	27 000	7,4%

Los casos de sólo se detectan diferencias se reportan al Instituto Nacional de Semillas (INASE) para que proceda a realizar las verificaciones en campo.

A partir de esta información, se obtiene que apenas el 1% del volumen analizado por URUPOV de semilla reservada para uso propio (Ciclo 2020) presentaría algún tipo de irregularidad.

5 CONCLUSIONES

- Se logró definir un set de 12 marcadores moleculares para todos los cultivares de soja sembrados en Uruguay, a partir de "Dupplier-INAE" a través de PCRs con sondas SAGP.
- Se obtuvo la matriz de referencia para estos variedades logrando resultados con altos niveles de precisión (mayor al 99%).
- Se definió los criterios, procedimientos y protocolos para la selección de la muestra de productores, extracción de las muestras a campo, identificación, envío, recepción, procesamiento, análisis y presentación de resultados.
- Finalmente, **se confirma que el uso de los marcadores moleculares para la observancia de los derechos del obtentor, es una herramienta consumente efectiva, rápida y de bajo costo en relación a los resultados e impactos que generan.**