

PROGRAMA DE FORMACION  
Recepcionado 18/11/02  
Nº Ingreso 307

## CONTENIDO DEL INFORME TÉCNICO

### PROGRAMA DE FORMACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

#### 1. Antecedentes Generales de la Propuesta

Nombre: Sergio Diez de Medina

Código: BID-FP-V-2002-1-A-019

Entidad Responsable Postulante Individual: Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA-La Platina)

Coordinador: Humberto Prieto Encalada

Lugar de Formación: 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)
Sergio Diez de Medina Roldán	INIA – La Platina	Investigador, área Biotecnología	
Simona de Felice	INIA – La Platina	Investigador, área Biotecnología	

#### Problema a Resolver:

Esta gira tecnológica surge de la necesidad de perfeccionamiento en el área biotecnológica para la evaluación de híbridos interespecíficos entre *Brassica napus* genéticamente modificada a través de transgenia y sus parientes silvestres, un riesgo medioambiental, debido a flujo génico vertical, tras la incorporación de cultivos genéticamente modificados sobre la biodiversidad silvestre chilena.



29

## Objetivos de la Propuesta

### **2. Antecedentes Generales:**

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 persigue que dichos investigadores adquieran criterios, modos de operación y de planificación, ante estudios que involucran el manejo de material transgénico y su interacción con el medioambiente.

El Objetivo General se entiende como una mezcla de las concepciones biológico-agronómica y biológico-molecular. Según esto, se proponen 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. Desarrollar nuevos marcadores moleculares considerando el carácter de autoincompatibilidad.
3. 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 O1-A-14.

### 3. Itinerario Realizado:

8.- ITINERARIO PROGRAMA DE TRABAJO			
FECHA (Día-mes-año)	ACTIVIDAD	OBJETIVO	LUGAR
3 Julio – 17 Julio 2002	Entrenamiento básico en técnicas moleculares empleadas en la evaluación del flujo génico	1. Incorporación al programa de evaluación de flujo génico para Brassica. 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 previamente descritos (y PCR)	Reading
18 Julio –1Agosto 2002	Entrenamiento básico en bioinformática empleadas en diseño de marcadores moleculares	1. Incorporación al programa de evaluación de flujo génico para Brassica. 1.1. Desarrollar nuevos marcadores moleculares y aplicación al modelo <i>Brassica</i> . 1.2 Secuenciar productos positivos de PCR de nuevos marcadores	Reading
1 Agosto – 20 Agosto 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. 1.1 Participar en ensayos de campo para la selección de material a ser analizado.	Reading
20 Agosto – 1 Septiembre 2002	Establecimiento de protocolos para realizar prospecciones para estudios de simpatría 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

### 3.1 Hibridación manual en invernadero con plantas de *Brassica*

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 fue la única estructura floral restante, se polinizaron 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.

La planta se cubrió con una bolsa de plástico microperforada para impedir a polen foráneo la posible polinización.

#### 3.2.1 Extracción de DNA.

El protocolo que se ha utilizado para efectuar la extracción de DNA desde las plantas de *Brassica* es, brevemente:

- Se maceró material fresco (hojas) en morteros con nitrógeno líquido y se agregaron 600  $\mu$ l de solución amortiguadora de extracción SDS (EDTA disódico 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 20 min.
- Se centrifugó a 14.000 rpm por 5 min.
- Se tomaron 400  $\mu$ l de fase acuosa y se 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 dos veces con etanol al 70% (v/v) 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 para la utilización en reacciones de PCR. 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 ha realizado una electroforesis del DNA en geles de agarosa al 0,8%. La corrida se realizó en soluciones amortiguadoras TAE 1X (Sambrook *et al.*, 1989) a 100 V. El DNA se visualizó tiñendo el gel con bromuro de etidio y exposición con luz UV.

### **3.3 Análisis de los potenciales híbridos.**

#### **3.3.1 Diseño de partidores específicos para genes de autoincompatibilidad.**

Se diseñaron partidores específicos para el gen *srk* que determina autoincompatibilidad en *Brassica*, utilizando las secuencias presentes en el web <http://brassica.bbsrc.ac.uk/>, las que posteriormente se alinearon mediante Clustal-W, presente en el web [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk), en base a esto se diseñaron 9 parejas de partidores, determinadas por 10 partidores (que son comunes para las especies *B. napus*, *B. oleracea* y *B. rapa*).

#### **3.3.2 Predicción de formación de híbridos por expresión de gen de autoincompatibilidad *srk*.**

##### **3.3.2.1 Análisis por Amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)**

Se utilizaron en primera oportunidad partidores previamente diseñados por Nishio y cols. (Theor. Appl. Genet (1997) 95: 335-342), para amplificar la zona que codifica para la región intracitoplasmática de la proteína de membrana SRK (que aparentemente participa en la formación de híbridos interespecíficos) y posteriormente se utilizaron las 9 parejas de partidores diseñados mediante primer master

La reacción (20  $\mu$ l de volumen total) consistió en DNA genómico de *Brassica* en dilución 1:10 (2  $\mu$ L), una unidad de Taq polimerasa, 2,0  $\mu$ l de amortiguador de reacción 10X (a una concentración final de 1X), 0,5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) a concentración a final de 1,5 mM, 0,5  $\mu$ l de mezcla de dNTPs (Boehringer Mannheim, 5 mM cada nucleótido) a concentración final de 0,5 mM, y 0.3  $\mu$ l de cada partidador (10 mM) a una concentración final de 0,2  $\mu$ M.

Las reacciones de PCR se desarrollaron de la siguiente manera: un primer paso de 2 minutos a 94 °C seguido de 34 ciclos de 1 minuto a 94°C, 30 sec a 55°C y 4 minutos a 72°C con una extensión final a 72 °C por 7 minutos, para finalmente conservar los productos a 4°C hasta su posterior análisis por electroforesis.

**TABLA 1:** Pares de partidores específicos para gen *srk*.

Nombre	Partidor Forward	Nombre	Partidor Reverse
Fpkor	5'ATgTgAgAAgAggTgCCTTAgCgA3'	Rpkred	5'TTCCAAgCATCCAAACCACCgACg3'
Fpkcy	5'gAAgAggTgCCTTAgCgATTgTAA3'	Rpkred	5'TTCCAAgCATCCAAACCACCgACg3'
Fpkcy	5'gAAgAggTgCCTTAgCgATTgTAA3'	Rpkblue	5' gCggTTTAggCTgAggAATCTCTg3'
Fpkleaf	5'ggTgggACgggTTgTgTgATTTgg 3'	Rpkblue	5' gCggTTTAggCTgAggAATCTCTg 3'
Fpred	5'ggAAACAAAATCgAgCAAAAgCAA3'	Rpkred	5'TTCCAAgCATCCAAACCACCgACg3'
Fpkgreen	5'gTTCTgCCTTTggAAAaggAAACA3'	Rpkgreen	5'TTCCAAgCATCCAAACCACCgACg3'
Fpkfos	5'gAgCAAAAgCAATggCAACATCTA3'	Rpkgreen	5'TTCCAAgCATCCAAACCACCgACg3'
Fpkblue	5' TCTgATCATgTTCTgCCTTTggAA3'	Rpkblue	5'gCggTTTAggCTgAggAATCTCTg3'
Fpkfos	5' AgCAAAAgCAATggCAACATCTA3'	Rpkblue	5'gCggTTTAggCTgAggAATCTCTg3'

### 3.3.2.2 Separación por electroforesis

Se realizaron electroforesis cargando 5 µl de producto de PCR en geles de agarosa al 1% en solución buffer TAE 1X. La corrida se realizó en soluciones amortiguadoras TAE 1X (Sambrook *et al.*, 1989) a 100 V. El DNA se visualizó tiñendo el gel con bromuro de etidio y exposición con luz UV.

### 3.3.2.3 Secuenciación de fragmentos amplificados mediante PCR.

Se procedió a cortar las bandas obtenidas por amplificación mediante PCR y separadas por electroforesis en gel de azarosa, las cuales fueron pesadas, y se extrajo y purificó el producto mediante el kit de extracción de bandas "Nucleospin Extract Kit". Posteriormente se utilizaron 5,6 µl de éste producto para realizar la reacción de secuenciación, en conjunto con 4 µl de mezcla BigDye y 0,4 µl de partidor (sólo forward o reverse). La reacción consistió en 35 ciclos de 96°C por 30 segundos, seguido de 15 segundos a 50 °C y 60°C por 4 minutos. El producto de la reacción de secuenciación fue puesto en un cartucho de gel de filtración AGTC y fue centrifugado por 2 minutos a 2700 rpm, el producto filtrado finalmente se centrifugó en speedvac por 25 minutos a 60 °C, el cual finalmente se envió para análisis al laboratorio de secuenciación del Departamento de biología molecular, Plant Sciences School, University of Reading.

### 3.4 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 de los fenotipos de los híbridos formados en invernadero, se buscaron a los bordes de predios y entre predios de canola 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 recolectadas 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 bolsa 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 tramite correo express (DHL) a Holanda donde fueron analizadas por citometro de flujo.

#### **4. Resultados Obtenidos:**

##### **4.1 Extracción y análisis de calidad de DNA.**

El método de extracción fue modificado, poniendo el paso de agregar RNAsa al final de la extracción, para evitar la presencia de RNA contaminante en el producto final (Fig 1).

##### **4.2 Predicción de formación de híbridos por expresión de gen de autoincompatibilidad.**

El objetivo a desarrollar fue el diseñar marcadores moleculares nuevos que permitan diferenciar especies (marcadores específicos), y además permitan predecir la formación de híbridos interespecíficos entre *B.napus* y *B. rapa*, basándose en la participación en el favorecimiento de híbridos por parte del sistema de autoincompatibilidad en *Brassica*, que está determinado primordialmente por la proteína de membrana SRK, presente en la papila estigmática de la hembra. La idea es obtener un marcador de especie a la vez de un marcador de hibridación.

Primeramente se obtuvieron reiterativos resultados negativos con los partidores descritos por Nishio y cols (Theor. Appl. Genet (1997) 95: 335-342) para la región intracitoplasmática de *srk* (fig 2) pese a que se modificaron numerosas veces las condiciones de PCR, por lo cual se tuvieron que diseñar nuevos partidores que incluyeran las zonas polimórficas del gen *srk* (exones II y III), obteniéndose resultados positivos tanto para *B. oleracea* como para *B. napus* (fig 3) con el par de partidores Fpkcy-Rpkblue.

Por su parte, la cantidad fragmentos obtenidos en la amplificación de *srk*, lamentablemente fueron insuficientes para desarrollar la secuenciación de los productos observados previamente por electroforesis.

#### **5. Aplicabilidad:**

Dentro del contexto del proyecto "Desarrollo de un sistema de trazabilidad molecular y de evaluación sobre la biodiversidad local de plantas genéticamente modificadas a través de transgenia", los conocimientos obtenidos tienen como utilidad tener un nuevo parámetro a evaluar para fiscalizar flujo génico vertical de transgenes insertados a cultivos comerciales, que se refiere a la predicción de la formación de híbridos interespecíficos mediante la observación de presencia del gen *srk*, que determina la autoincompatibilidad

en *Brassica*, el cual estaría actuando como favorecedor de la formación de híbridos interespecíficos.

Es de mucho interés predecir y evaluar la formación de híbridos interespecíficos debido a que particularmente en Chile existen cultivos de *B. napus* genéticamente modificada (con resistencia a herbicida glifosato), la cual puede formar híbridos interespecíficos con *B. rapa* (que en Chile está presente como maleza), y así tener el potencial riesgo de que el transgén escape a blancos no deseados.

#### 6. Contactos Establecidos:

Institución/Empresa	Persona de Contacto	Cargo/Actividad	Fono/Fax	Dirección	E-mail
University of Reading	Dr. Mike Wilkinson	Director de investigación área Biotecnología "School of Plant Sciences, University of Reading"	Fono: (0118) 931 8072 Fax: (0118) 975 3676	Whiteknights PO Box 221 READING Berkshire RG6 6AS United Kingdom	<a href="mailto:m.j.wilkinson@reading.ac.uk">m.j.wilkinson@reading.ac.uk</a>
University of Reading	Sta. Giulia Cuccato	Investigador área Biotecnología "School of Plant Sciences, University of Reading"	Fono: (0118) 931 8072 Fax: (0118) 975 3676	Whiteknights PO Box 221 READING Berkshire RG6 6AS United Kingdom	g.cuccato@reading.ac.uk

#### 7. Detección de nuevas oportunidades y aspectos que quedan por abordar:

Entre las proyecciones que se manejan posteriormente a los resultados obtenidos en la estadía en University of Reading, son:

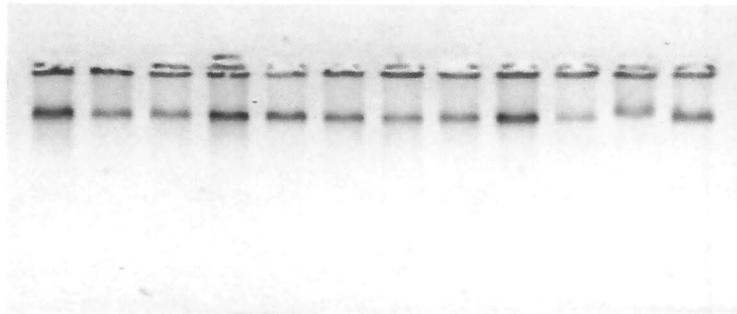
- Buscar nuevos partidores para amplificar cada región por separado (región S, dominio transmembrana, y región kinasa intracitoplásmica) del gen *srk*.
- Clonar y secuenciar resultados positivos.
- Utilizar como marcador de especie y predecir autoincompatibilidad en poblaciones chilenas cuarentenarias.

#### 8. Resultados adicionales:

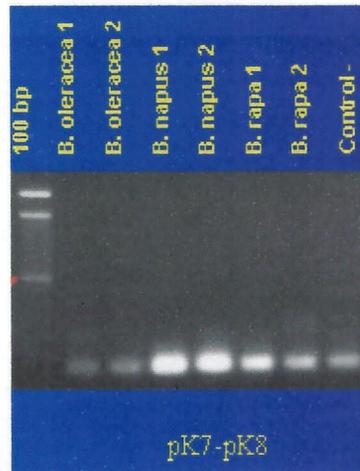
Los objetivos adicionales planteados en el punto anterior, se han estado desarrollando durante los últimos meses en el Laboratorio de Biotecnología de INIA-La Platina. En el cual se han diseñado pares de partidores específicos para cada región (región S, dominio transmembrana, y región kinasa intracitoplásmica), obteniendo resultados positivos para la región kinasa de *srk* (fig 4), los cuales fueron posteriormente insertados en el plasmidio P-Gem T easy vector de Promega, los que fueron utilizados para transformar cepas DH5- $\alpha$  de *e. coli* (fig 5) y realizar el clonamiento respectivo producto que será utilizado para la secuenciación de los fragmentos.

### 9. Material Recopilado:

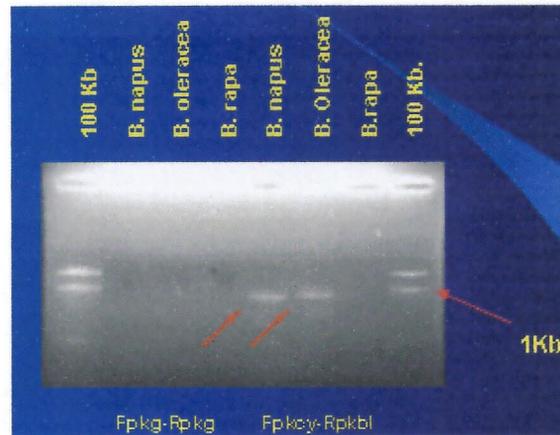
Tipo de Material	Nº Correlativo	Caracterización
Figura	1	Extracción DNA <i>Brassicas</i> .
Figura	2	Amplificación con partidores (pk7-pk8) diseñados por Nishio y cols. para región intracitoplasmática de <i>srk</i> .
Figura	3	Amplificación con partidores (pk7-pk8) diseñados durante estadía en Reading University, para región que incluye exones II y III de <i>srk</i> .
Figura	4	Amplificación con partidores diseñados para la región kinasa de <i>srk</i> . Kin2 (líneas 1-7) y Kin3 (líneas 9-15)
Figura	5	PCR de colonias transformadas con P-Gem T easy vector-kin3, previamente amplificadas en <i>B. napus</i> .



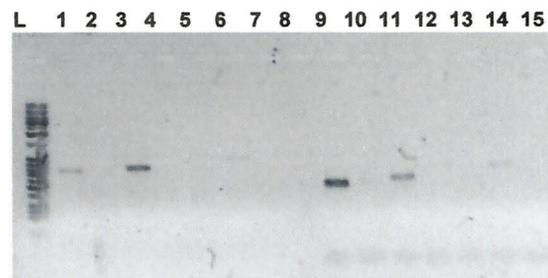
**Fig. 1:** Extracción DNA *Brassicas*.



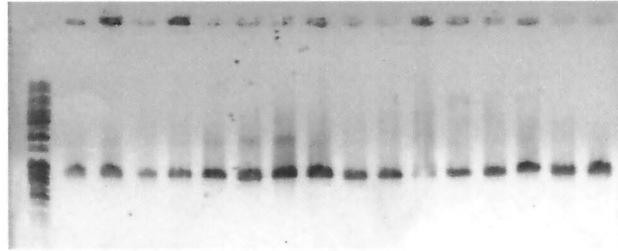
**Fig. 2:** Amplificación con partidores (pk7-pk8) diseñados por Nishio y cols. para región intracitoplasmática de *srk*.



**Fig. 3:** Amplificación con partidores (pk7-pk8) diseñados durante estadía en Reading University, para región que incluye exones II y III de *srk*.



**Fig 4:** Amplificación con partidores diseñados para la región kinasa de *srk*. Kin2 (líneas 1-7) y Kin3 (líneas 9-15). *B. napus* (líneas 1 y 9), *B. oleracea* (líneas 2 y 10), *B. rapa* (líneas 3 y 11), *B. juncea* (líneas 4 y 12), híbridos triploides (líneas 5,6,13 y 14), controles negativos (líneas 8 y 15).



**Fig. 5:** PCR de colonias transformadas con P-Gem T easy vector-kin3, previamente amplificadas en *B. napus*.

## 10. Aspectos Administrativos

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

#### a. Conformación del grupo

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

#### b. Apoyo de la Entidad Responsable

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

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

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

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

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

### 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		

## 11. Conclusiones Finales

El conocimiento adquirido en la aplicabilidad del estudio del sistema de autoincompatibilidad para la evaluación de la formación de potenciales híbridos interespecíficos entre *B. Napus* y sus parientes silvestres fue el esperado, y el desarrollo de los marcadores para la predicción de la formación de éstos híbridos ha sido satisfactorio, los cuales serán utilizados para el estudio de flujo génico en poblaciones cuarentenarias chilenas, durante el desarrollo del proyecto de bioseguridad también apoyado por el FIA.

Según los resultados obtenidos se puede concluir que la pareja de partidores Fpkcy-Rpkbl cumplen con los parámetros establecidos, ya que de partida nos permiten diferenciar las especies *B. napus* y *B. oleracea* , y se puede decir que estamos en presencia de un

nuevo marcador de genoma, que en este caso sería para diferenciar plantas con genoma C (común para estas dos especies), por su parte el par de marcadores Kin 2 y Kin 3 (desarrollados en INIA-La Platina) satisfacen en mayor amplitud los objetivos planteados, ya que de partida, presentan amplificación *B. napus* y *B. rapa*, además de mostrar amplificación en los híbridos formados por estas dos especies que es el objetivo de interés, particularmente pudiendo observarse una diferencia de tamaño en el amplicón de cada especie, concluyendo que posterior a la formación del híbrido interespecífico se puede estar en presencia de un reordenamiento del gen *srk*, resultado que arroja la posibilidad de que el péptido que es codificado por éste fragmento estaría favoreciendo la reacción de reconocimiento de la planta receptora del polen foráneo, lo que facilitaría la formación de híbridos interespecíficos por sobre la reacción de autopolinización, indicando que *srk* sería una excelente herramienta para considerar a la hora de evaluar flujo génico de transgén de resistencia a herbicida (glifosato).

#### 11. Conclusiones Individuales:

El desarrollo de la actividad de formación en la Universidad de Reading ha cumplido con los objetivos planteados, en el contexto de la generación de nuevas herramientas para la evaluación de híbridos interespecíficos, el conocimiento obtenido y técnicas aprendidas. Además de la interacción establecida con el laboratorio de Mike Wilkinson en dicho establecimiento que puede contribuir ampliamente en el desarrollo del proyecto "Desarrollo de un sistema de trazabilidad molecular y de evaluación sobre la biodiversidad local de plantas genéticamente modificadas a través de transgenia"

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre y Firma coordinador de la ejecución: \_\_\_\_\_

AÑO 2002