

Producción de semillas de alfalfa en el VBRC

Mitigación de la contaminación con transgenes

ISSN 0328-3399 Informe técnico N° 80



Producción de semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) en el VBRC

Mitigación de la contaminación con transgenes

Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria



Secretaría de Agricultura,
Ganadería y Pesca



Ministerio de Economía
Argentina

Producción de semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) en el VBRC. Mitigación de la contaminación con transgenes.

Renzi, J.P.^{1,4}, García, F.¹, Crisanti, P.¹, Rodríguez, G.¹, Bruna, M.¹, Quintana, M.¹, Reinoso, O.¹, Vanzolini, J.I.^{1,4}, Coito, C.², Ancia, V.², Guasch, P.³, Arditti, S.³, Gaido, E.⁵, & Cantamutto, M.A.^{1,4,6}

Resumen

La contaminación de las semillas de alfalfa con variedades transgénicas o genéticamente modificadas (GM) preocupa a los semilleros instalados en el Valle Bonaerense del río Colorado (VBRC). En función de los últimos diagnósticos realizados, resultará muy difícil lograr que las semillas se encuentren completamente libres de impurezas GM. En este informe se describen las posibles fuentes de contaminación, para delinear estrategias de manejo a nivel de lote y de gestión a escala predial para evitar o minimizar la contaminación con transgenes. Se propone emplear un método de detección fenotípico/proteico específico desarrollado en el INTA Hilario Ascasubi para realizar controles de contaminación en diferentes instancias del entramado productivo-comercial. El enfoque de organización por “barrios de producción” requiere una participación colaborativa de los actores de la cadena, pero a su vez presenta una oportunidad única para la valorización de la producción generada en la región. Se recomienda el establecimiento de umbrales de tolerancia de contaminantes GM para la producción de semilla de alfalfa convencional.

¹ INTA Hilario Ascasubi. ² Southern Seeds. ³ Guasch Semillas. ⁴ UNS Departamento de Agronomía. ⁵ Municipalidad de Patagones. ⁶ CERZOS-CONICET

Introducción y marco general

El Valle Bonaerense del río Colorado (VBRC) posee excelentes condiciones agroecológicas e infraestructura para la producción de semillas de numerosas especies forrajeras de clima templado. Entre ellas, la de mayor relevancia es la alfalfa. Luego de más de 50 años de trayectoria local, actualmente la alfalfa del Valle constituye alrededor del 70% de la semilla fiscalizada nacional, con 1.500 t año⁻¹ y cosechadas en 5.500 ha (Lucanera *et al.*, 2011-21).

En el VBRC el número de establecimientos donde se localizan los lotes de producción de semilla fiscalizada suman algo más de 80. El 63% de los cultivos de alfalfa semilla están localizados en proximidades de Villalonga que es un sector con establecimientos de mayor superficie que el promedio del Valle. Las empresas vinculadas en forma directa a la semilla de alfalfa rondan la decena mientras que se cuenta con cinco plantas de procesamiento y limpieza de esa semilla. Tres empresas comercializadoras de semilla (semilleros) se encuentran radicadas dentro del área de influencia del VBRC. La cosecha de los cultivos para semilla se realiza por intermedio de unas ocho empresas contratistas locales que cuentan con la maquinaria adecuada. Los cultivos de alfalfa para semilla también utilizan el servicio de polinización brindado por apicultores locales, muchos de ellos nucleados en cooperativas.

En el último quinquenio se produjeron cambios ambientales, de manejo tecnológico, políticos y de mercado, que impactaron sobre las perspectivas del rubro. Uno de los cambios más significativos fue la liberación de los eventos biotecnológicos (KK179, J101 y J163) de alfalfa genéticamente modificada (GM) o transgénica (Resol. MINAGRO 33/2018 y Resol. 2021/139 APN-SABYDR#MAGYP). La producción de esta semilla actualmente proviene de EEUU. A pesar de ello, algunas partidas contaminadas con este tipo de eventos originaron algunos inconvenientes para la comercialización de la semilla legal. También se estima que, antes de la autorización del cultivo para forraje, ocurrieron ingresos ilegales de semilla de alfalfa GM, que se dispersó en diferentes áreas del país.

La difusión de la alfalfa GM aumentó la posibilidad de contaminación de la semilla convencional (no GM) mediado por flujo génico o por mezcla física. Dado que el umbral

de contaminación en las partidas de semillas producidas en el país es cero, la presencia de plantas GM amenaza directamente la comercialización de las semillas. Algunos productores locales tuvieron rechazos de sus partidas debido a la presencia de trazas de GM en sus semillas (Renzi *et al.*, 2018).

En este contexto complejo, el entramado socio-técnico local plantea la necesidad de discutir alternativas para que la producción de semillas de alfalfa continúe siendo una actividad rentable. Para ello, resulta prioritario diseñar alternativas para monitorear la producción de semilla, evitar su contaminación y la eventual pérdida de mercados nacionales o internacionales sin tolerancia a los organismos/vegetales GM. Un ordenamiento territorial en base al monitoreo, que asegure ausencia de contaminación, motivará la generación de nuevos negocios, como miel o heno libre de organismos GM, que generalmente tienen un precio diferencial en los mercados sensibles de transgénicos (ej. China). Cerca del área de estudio (< 150 km) se encuentra el puerto de Bahía Blanca activo en la exportación de productos agropecuarios, incluyendo heno de alfalfa.

Actualmente la empresa que comercializa en Argentina la semilla de alfalfa transgénica (GM) *HarvXtra*; eventos J101+KK179, declara que no ha comercializado semillas dentro del área del VBRC. Este condicionante favorece las posibilidades de corregir el problema mediante la purificación de las partidas de semillas actualmente disponibles en el VBRC y el monitoreo de posibles contaminaciones con alfalfa GM. El saneamiento debe incluir también los eventos J163 y J163xJ101, que también confieren tolerancia al glifosato en las variedades, cuya comercialización de los eventos incorporada en las variedades no ha sido hasta el momento aprobada. Asimismo, la empresa tampoco planea producir semilla de alfalfa con la tecnología *HarvXtra* a nivel nacional. La semilla requerida para abastecer nuestro mercado, se produce en EEUU, país desde donde se la importa (com. pers. R. Rossanigo).

Para el monitoreo del agroecosistema del VBRC y diseñar alternativas para la producción de semilla de alta pureza, resulta fundamental realizar un diagnóstico del nivel de contaminación inicial y establecer un procedimiento para robustecer la producción de alfalfa no GM, en consenso entre productores locales dentro de la cadena de alfalfa, semilleros e instituciones locales.

En este Informe Técnico, producto del trabajo desarrollado durante los años 2020-2022 en el marco del proyecto local denominado “Zona diferencial norpatagónica para la producción de alfalfa no transgénica”, se muestran los avances en el diagnóstico de contaminación con alfalfa GM, información sobre posibles fuentes de contaminación, y medidas de mitigación propuestas a nivel de lote y en conjunto entre establecimientos/predios productivos.

Presencia de alfalfa transgénica (GM) y posibilidad de escape

Antecedentes

El primer registro de presencia de contaminantes de alfalfa GM (genéticamente modificada = transgénica) en el VBRC ocurrió con semilla procesada durante la temporada 2015/16. Desde ese momento, hasta el último análisis en 2020/21, la presencia de semillas GM en lotes se mantuvo constante. En la Planta de Limpieza y Clasificación de Semillas operada por la Asociación Cooperadora de la EEA H. Ascasubi (ACOOPA), el número de lotes contaminados dependiendo de la campaña se mantuvo entre un rango de 9% y 21%, equivalente al 6% y 23% del total de semilla procesada (Renzi *et al.*, 2021).

Durante la temporada 2020/21, en 8,16% de las poblaciones ferales de alfalfa (plantas voluntarias o “guachas”) se hallaron contaminantes transgénicos. Se considera que este escape sería reciente, debido a que durante el 2015/16 no se habían detectado plantas GM en las poblaciones ferales. Esto es diferente de lo que había sido observado en la Planta de Semillas de la ACOOPA durante la misma temporada (Renzi *et al.*, 2021).

Posibilidad de escape

Existen dos formas posibles a través de las cuales puede ocurrir la contaminación con GM: *i)* mediante mezcla física de semillas, denominada “contaminación mediada por semillas”, o *ii)* mediante flujo génico, denominada “contaminación mediada por polen” (Van Deynze *et al.*, 2008).

La contaminación mediada por semillas puede aparecer cuando las máquinas de siembra, cosecha, medios de transporte u otras maquinarias, no son des-contaminadas al comenzar el manipuleo de una nueva partida de semillas. Por su parte, el flujo génico consiste en la transferencia del transgen (en este caso con resistencia a glifosato) mediante el polen que se transfiere de una alfalfa GM a la descendencia de otra alfalfa no GM (Figura 1). En alfalfa, el cruzamiento es elevado, debido a su sistema de reproducción alógama entomófilo, es decir cruzada y por insectos polinizadores. Es importante señalar que la ocurrencia e intensidad del flujo génico va a depender de la separación física o aislamiento entre plantas GM y no GM, de la sincronización en la floración para que ocurra la polinización, de la presencia y eficiencia de agentes polinizadores (principalmente abeja melífera, pero no exclusiva). También depende de la posibilidad de formación y madurez de semillas producto de la hibridación GM x no GM. Por otro lado, la intensidad del flujo génico también va a depender de la frecuencia de plantas GM dentro de la población emisora. La frecuencia del transgen muestra un gradiente creciente desde poblaciones ferales (voluntarias o “guachas”), donde existirá una baja densidad de plantas, pasando por cultivos contaminados con “bajos niveles de material GM”, hasta cultivos con alto porcentaje de plantas GM (Van Deynze *et al.*, 2008; Bagavathiannan *et al.*, 2012).

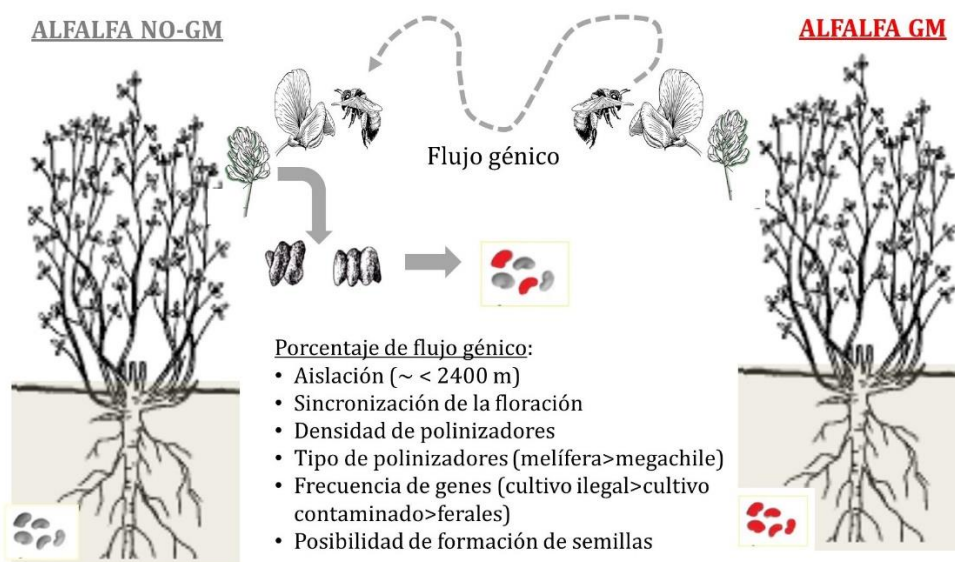


Figura 1. Flujo génico entre una planta de alfalfa tradicional y otra “genéticamente modificada” (GM).

En la Figura 2 se representa un esquema simplificado de las posibilidades de interacción entre cultivos convencionales no GM y cultivos GM. El peor escenario, con mayor probabilidad de flujo génico, se produce cuando los cultivos destinados a la producción de semilla se multiplican en cercanías de cultivos GM que alcanzan a florecer. La intensidad del flujo génico se incrementará en la medida que el aislamiento físico y/o temporal entre lotes se reduzca, la floración sea más convergente, exista una alta densidad de polinizadores con amplio rango de vuelo y se permita la maduración de la semilla.

Los cultivos de alfalfa destinados a forraje, con cortes mecánicos o mediante pastoreos comenzados a inicios de floración, limitarán la intensidad de flujo génico. La intensidad del flujo génico también se reducirá en poblaciones ferales contaminadas con GM que sean manejadas con desmalezados frecuentes (Van Deynze *et al.*, 2008). Debido a que en el VBRC el aprovechamiento más frecuente es bajo pastoreo directo, resulta altamente posible que las plantas lleguen a floración avanzada, incrementando así el riesgo de flujo génico. Por lo tanto, los manejos de corte/pastoreos previos a o durante inicios de floración en cultivos GM no asegurarían mantener ausencia de contaminación mediada por polen en distancias de aislamiento reducidas (< 2400 m).

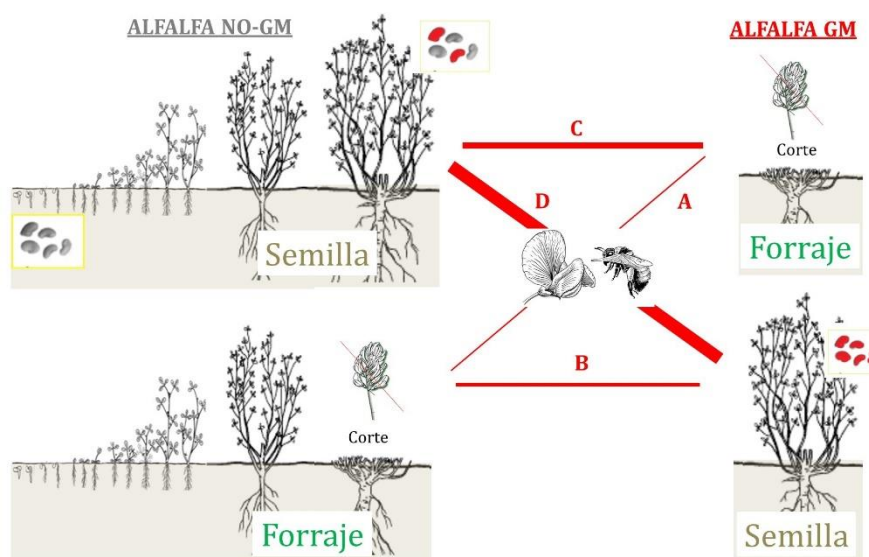


Figura 2. Esquema simplificado de las posibilidades de flujo génico entre plantas de alfalfa no-GM (der.) y GM (izq.). Líneas de mayor espesor indican mayor probabilidad de flujo génico. Posibles interacciones: A) cultivo no GM destinado a forraje con manejo del corte (pastoreo-mecánico) y cultivo GM con el mismo destino, B) cultivo no GM destinado a forraje y cultivo GM

destinado a semilla C) cultivo no GM destino semilla y cultivo GM destino forraje y D) cultivo no GM destino semilla y cultivo GM con el mismo destino.

Otra situación posible es la proliferación de progenie GM producto del flujo génico. Esta condición cobra factibilidad cuando cultivos o poblaciones ferales contaminadas con GM producen semilla. El establecimiento de plántulas híbridas en cultivos de alfalfa o en poblaciones ferales preexistentes, va a depender de varios factores. Por un lado, en la planta madre está la posibilidad de producción de semilla viable, la dehiscencia y diseminación, la germinación luego de perder dormición física y el establecimiento de la plántula híbrida. La implantación y persistencia de las plantas cruza con GM también va a depender de los niveles de competencia y auto-alelopatía. Esta condición se reduciría a niveles de muy baja probabilidad, si la presión de selección no favorece el establecimiento de la progenie GM, como ocurriría si se realizara la aplicación de glifosato (Greene *et al.*, 2015).

Escapes detectados en el VBRC

Ciclo 2021/22

Durante el relevamiento de poblaciones ferales realizado en la temporada 2021/22 se encontró que la presencia del transgen que confiere resistencia a glifosato se incrementó notoriamente, en relación al relevamiento anterior que había llegado a 8,2% (Renzi *et al.*, 2021). En 2021/22, sobre 45 poblaciones ferales relevadas se halló que 25 tenían presencia de GM, es decir el 55,6% de contaminación. La intensidad de la presencia del transgen en la progenie de las poblaciones contaminadas (Figura 3) mostró rango desde $< 0,1$ a 21,3% de individuos GM. Dado que en las plantas madres de las poblaciones ferales no contaban con la presencia del transgen, se asume que la contaminación había ocurrido en la misma estación en que se hizo el relevamiento, y a través de flujo génico mediado por polen. Por ello se detectó solo en la progenie (semillas).

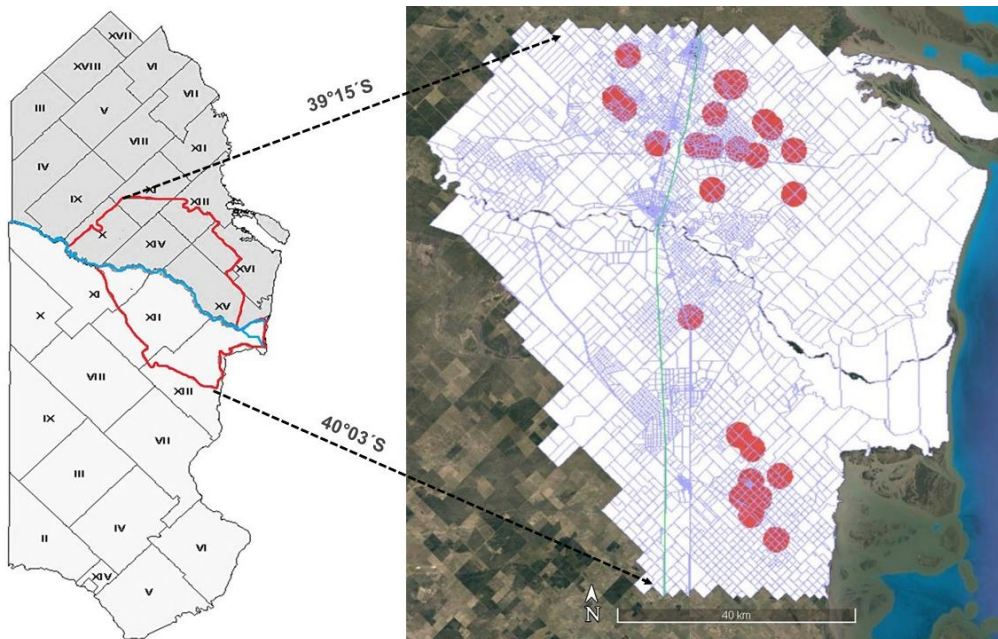


Figura 3. Poblaciones ferales (voluntarias o “guachas”) de alfalfa relevadas en la temporada 2021/22. Las plantas madres no eran transgénicas (no-GM), pero en sus semillas se detectó la presencia del transgen de resistencia a glifosato (GM), en porcentajes variables desde 0,1 a 21,3%.

Aislamiento

Un adecuado aislamiento puede prevenir la contaminación desde fuentes con plantas GM. Algunos estudios realizados en otros países muestran que, para lograr niveles muy bajos de contaminación, cercanos a <0,05% se requieren aislaciones de ~ 2400 m (Fitzpatrick *et al.*, 2003; Teuber *et al.*, 2004, 2007; Van Deynze *et al.*, 2008; Putnam, 2006; Kesoju *et al.*, 2019). Evaluaciones locales, con muestreos en plantas ferales a diferentes distancias de fuentes de plantas GM, mostraron resultados similares, con aislaciones seguras a partir de los 2200 m de separación (Figura 4). Esta distancia de aislamiento supera ampliamente la reglamentadas en nuestro país para la producción de semilla de alfalfa (200 m máximo dependiendo de la categoría) (Moschetti *et al.*, 2008).

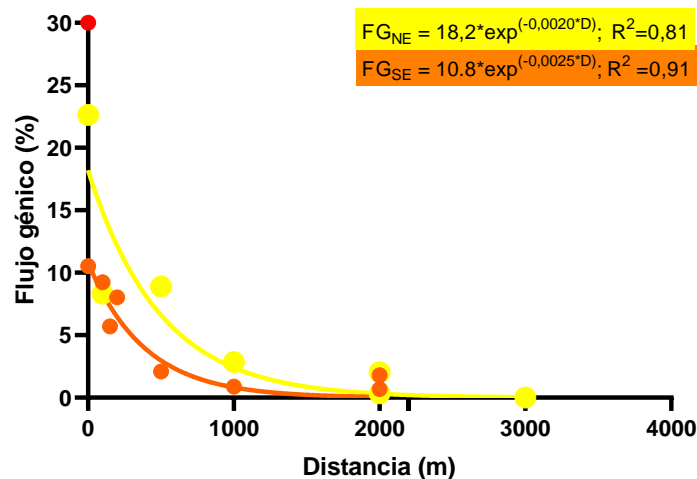


Figura 4. Flujo génico desde un cultivo de alfalfa GM a plantas ferales de la misma especie en dirección noreste (NE) y sureste (SE), para diferentes distancias de aislamiento. A diferentes intervalos de distancia desde un cultivo GM se muestrearon semillas de alfalfa de las plantas no-GM de la población feral y se cuantificó el porcentaje de GM en la progenie en el laboratorio de semillas de la EEA H. Ascasubi del INTA mediante un biotest fenotípico/proteico específico (CP4 EPSPS) desarrollado (datos no publicados).

Dos mil doscientos metros de aislamiento, ¿cómo impacta en el VBRC?

La gran distancia de aislamiento requerida para lograr condiciones seguras de producción (≥ 2200 m) determina que una gran cantidad de lotes para semilla de alfalfa sean inviables. Considerando la distribución de los lotes de las temporadas 2019/20 y 2020/21 (Figura 5), emerge que solamente el 33% o 26%, respectivamente mantendrían distancias seguras de aislamiento (Figura 6). Frente a este contexto, para asegurar la pureza genética de las semillas resulta necesario establecer medidas de mitigación que no se encuentran solamente supeditadas a nivel de lote.

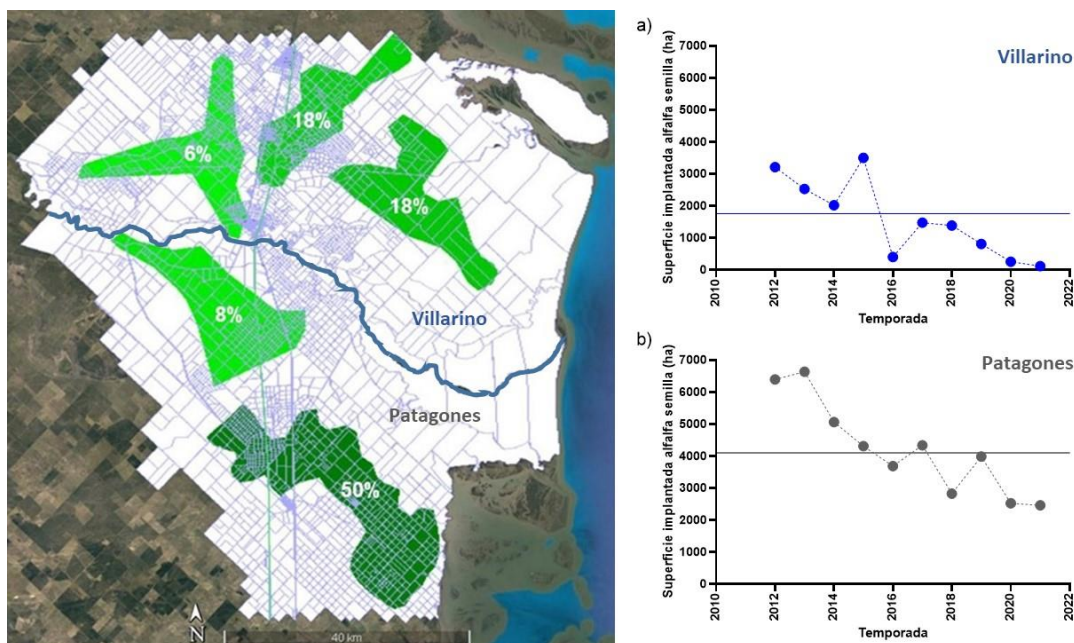


Figura 5. Mapa de distribución de lotes de producción de semilla de alfalfa no-GM durante dos temporadas 2019/20 (n=123) y 2020/21 (n=82). El porcentaje muestra la cantidad de lotes en cada sector en relación al total relevado (Fuente: INASE). Evolución de la superficie implantada de alfalfa con destino semilla en Villarino (a) y Patagones (b) durante la última década (Fuente: CORFO-UNS en <https://corfo.gob.ar/>). La línea muestra el promedio de superficie cosechada por partido durante las temporadas 2014-a-2018 (Fuente: INASE en <https://datos.magyp.gob.ar/>).

Considerando la posibilidad que las poblaciones ferales con GM sean la fuente de contaminación por polen, solo el 53,2% y 55,4% de los lotes de producción de semilla de 2019/20 y 2020/21 mantendrían a distancias de aislamiento segura (Figura 3).

El escenario actual requiere la organización de los productores locales para mantener su producción de semilla de alfalfa no-GM libre de posibles fuentes de contaminación. También, el establecimiento de un umbral de tolerancia de GM factible de lograr (ej. $\sim \leq 1\%$) resulta un componente legal crucial para mantener este rubro productivo dentro del VBRC.

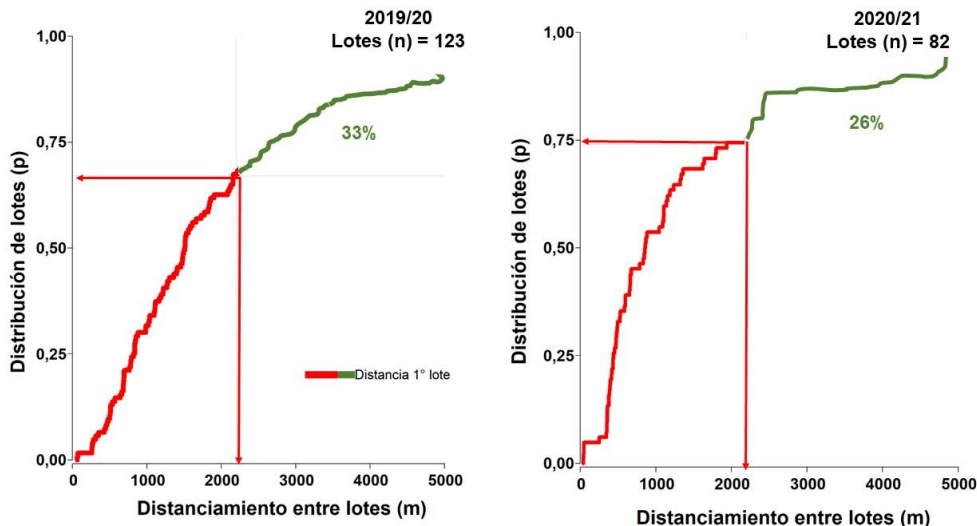


Figura 6. Distribución acumulada de la aislación (distancia al lote más cercano) en 123 lotes de producción de semilla de alfalfa no-GM durante la temporada 2019/20 y en 82 lotes durante 2020/21 en el VBRC (elaboración propia en base a datos del INASE).

Manejo a nivel de lote

Antecesor y siembra del cultivo

Para la producción de semilla de alfalfa un requisito legal es que el lote no tenga como antecesor alfalfa en los últimos 3 años. Ello es para evitar que exista resiembra y establecimiento de plantas voluntarias de otra variedad. Asimismo, no debe presentar problemas edáficos, con buena fertilidad química y libre de malezas de difícil control, como “cuscuta” (*Cuscuta* spp.), “gramón” (*Cynodon dactylon* L.), y “trébol de olor” (*Melilotus* sp) (Moschetti *et al.*, 2008).

Para iniciar un buen cultivo para cosecha de semilla de alfalfa, debe realizarse el análisis de germinación y pureza, que permiten ajustar la dosis de siembra para obtener un stand de plantas adecuado. Dado los altos niveles de contaminación con transgénicos se recomienda realizar la detección de contaminantes GM en las semillas destinadas a la siembra. Los valores mínimos exigidos incluyen un poder germinativo (PG) de 85%, pureza (P) de 98,5%, libre de malezas problemáticas (sorgo de alepo, abrepunos, llantén, cardos, trébol de olor, rúcula y cuscuta) y de semillas GM (Renzi *et al.* 2018).

La detección de contaminantes GM se puede realizar enviando las muestras a laboratorios de semillas que disponen del servicio o mediante la utilización de kits comerciales que detecta la expresión de la proteína CP4 EPSPS. El Laboratorio de Semillas de la EEA H Ascasubi del INTA diseñó un procedimiento fenotípico/proteico específico y dispone del servicio para los productores y técnicos locales.

Si los cultivos se inician con semilla impura, los niveles de contaminación se van a mantener inevitablemente en la semilla que se cosecha. Cuando el nivel de contaminación de la semilla muestra valores muy bajos (< 0,1%), dependiendo del genotipo dador de la resistencia, este nivel se mantendría si el cultivo de alfalfa se encuentra en equilibrio, o se puede reducir. Debido a la condición autotetraploide de la alfalfa, la transmisión de altos niveles del evento GM a la progenie ocurre cuando el inter-cruzamiento involucra a parentales que posean el transgen en condición triplex (AAA_) o cuádruplex (AAAA) (Basigalup, 2007) (Figura 9).

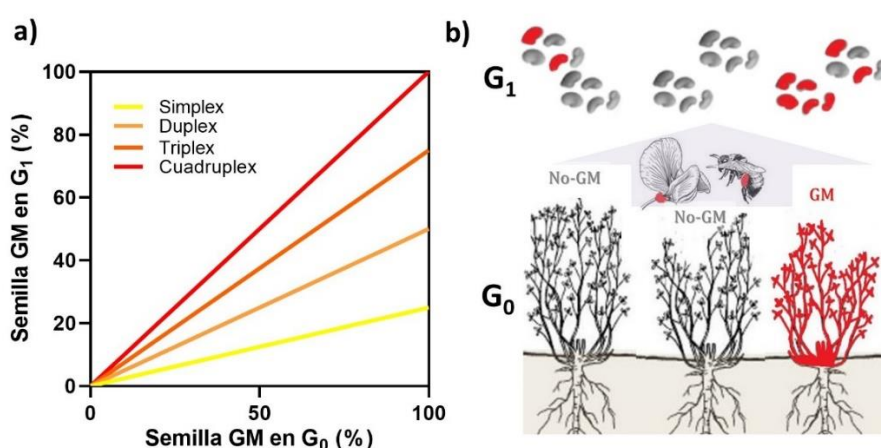


Figura 9. Relación entre porcentaje de contaminación con GM en la generación G_0 (siembra) y en su progenie (G_1) dependiendo del genotipo parental (a), esquema simplificado donde se muestra la G_0 y la G_1 .

Si los lotes para cosecha de semilla de alfalfa se implantan con semillas libres de GM, la única posibilidad de contaminación durante el cultivo sería mediante flujo génico (contaminación mediada por polen). Según las normas de fiscalización para producción de semilla de alfalfa, sería suficiente una aislación de 200 m. Tal como se ha explicado

anteriormente, teniendo en cuenta la eventual presencia de poblaciones ferales o cultivos contaminados con GM, separaciones superiores a 2200 m serían más seguras. Para ello, el manejo de la polinización es un aspecto clave de la producción, tanto para la obtención de altos rendimientos de semillas como para la cosecha de una semilla libre de contaminantes transgénicos (Moschetti *et al.*, 2008; Renzi *et al.*, 2021).

Polinización

La abeja doméstica puede viajar más de 5 km en busca de recompensa floral, con flora atractiva tiende a pecorear solo dentro de un radio de 1-2 km (Goodwin, 2012; Hagler *et al.*, 2011). Esa distancia máxima de pecoreo no necesariamente se correlaciona con el éxito de la transferencia genética (polen transferido resultante en una semilla), ya que la flor de alfalfa debe ser desenlazada para poder ser polinizada y la eficiencia de polinización de la abeja melífera es muy baja (Hagler *et al.*, 2011).

Por otra parte, el polen estará disponible solo por un período de tiempo corto antes de perder su vida útil. La viabilidad de los granos de polen y la receptibilidad del estigma varían, según la especie, desde menos de un día a más de una semana (Goodwin, 2012). En el caso de la alfalfa, existen registros de hasta 8 días de viabilidad del polen sobre la planta madre (Pankiw and Bolton, (1965) –cit. por Brunet *et al.*, 2019). En la práctica, una vez que el polen sale de la antera, su viabilidad disminuye. Brunet *et al.* (2019) analizaron el efecto de una serie de factores en la viabilidad del polen en diferentes variedades de alfalfa (convencional y transgénica). No encontraron diferencias entre variedades, ni entre las variedades transgénicas y las convencionales, tampoco hallaron efectos asociados a la temperatura. El factor que más afectó la viabilidad del polen fue el tiempo transcurrido desde que el polen es removido de las anteras. Según estos autores, la viabilidad de los granos de polen de alfalfa se encuentra entre 6 y 8 h, siendo los primeros 10 minutos los de mayor impacto en el flujo de genes (Brunet *et al.*, 2019).

En cuanto a las recomendaciones para la promoción de la polinización del cultivo de alfalfa, se considera de alta importancia el empleo de colmenas que no hayan estado en contacto previo con alfalfa (Bohart and Nye, 1976; Keogh *et al.*, 2010; Goodwin, 2012).

Esto se debe a que las abejas inexpertas producen el desenlace de la flor y por lo tanto la polinización, mientras que a medida que se acostumbran al cultivo aprenden a tomar el néctar por un costado de la flor, evitando el desenlace, y disminuyendo significativamente la eficacia de polinización. En base a esta recomendación y al corto período de viabilidad del polen de alfalfa, para minimizar el riesgo debe ponerse el foco en la distancia del lote a otras posibles fuentes de contaminación (> 2200 m).

Monitoreo pre-cosecha

En caso de sospechar o detectar la existencia de un cultivo o población cercana (< 2200 m) contaminada con alfalfa transgénica (GM), puede realizarse un muestreo pre-cosecha. Una contaminación en algún sector/es dentro del lote permitirá dividir el mismo para realizar la cosecha diferencial, solamente en aquellos sitios en los cuales no se detecten trazas de GM. Este monitoreo y análisis es eficiente y de utilidad cuando la producción se concentra en un solo lote de gran superficie dentro del predio. El tiempo de muestreo o análisis es mayor y más difícil de conducir en la medida que se incrementa el número de lotes. En esta última situación, el monitoreo coordinado entre establecimientos/predios a través del trazado de áreas controladas es más fácil de conducir.

Cosecha

La limpieza de la cosechadora y de los equipos de procesamiento post-cosecha es un recaudo a considerar, debido a que otra posible forma de contaminación es la mezcla física. Durante la cosecha mecánica, se recomienda descartar la semilla cosechada en las primeras pasadas y bordes del lote, para realizar en ella la eventual detección de GM. Luego, en la planta de limpieza y clasificación se puede realizar un análisis de GM antes y luego del procesamiento para seguir su trazabilidad. La cosecha de varios lotes dentro de un “barrio de producción” de alfalfa monitoreado facilitaría las operaciones para el mantenimiento de la semilla libre de GM.

Estrategia de mitigación entre predios

Una estrategia posible para evitar problemas de comercialización por contaminación puede ser el establecimiento de sectores organizados entre productores o “barrios de producción”. Durante la campaña 2021/22 se establecieron tres barrios de producción, con productores motivados por dos empresas locales comprometidas con la producción de semillas con alta pureza (Southern Seeds y Guasch). Dos de los barrios se localizaron cerca de la localidad de Villalonga y el otro en Pedro Luro. Para ello, resultó crucial una buena organización coordinada en consenso con los técnicos, productores y empresas locales para asegurar la aislación de los lotes.

La propuesta de planificación para la ampliación de los barrios o el establecimiento de nuevos sectores incluye los siguientes pasos:

- 1- Georreferenciar los lotes de alfalfa para semilla dentro del “barrio” constituido por los establecimientos adherentes (ejemplo Figura 7a). El establecimiento de los cultivos debe asegurarse con semilla libre de GM.
- 2- Establecer unidades de monitoreo (U.M.) dentro de cada lote y en la periferia del barrio (Figura 7b). Las U.M. consisten en parcelas de ~ 9 m² en las cuales no se realiza el corte de limpieza o sincronización en primavera (octubre/noviembre). De esta forma se puede anticipar la formación de semillas en las U.M. que se colectarán durante fines de diciembre o principios de enero (Figura 7b). Previamente se analizarán las plantas madres de la U.M., mediante la recolección de 50 folíolos al azar, para corroborar que no estén contaminadas.
- 3- La semilla colectada de cada U.M. se analiza en el Laboratorio de Semillas de la EEA H. Ascasubi del INTA mediante el biotest fenotípico/proteico específico (CP4 EPSPS) (Figura 7c).

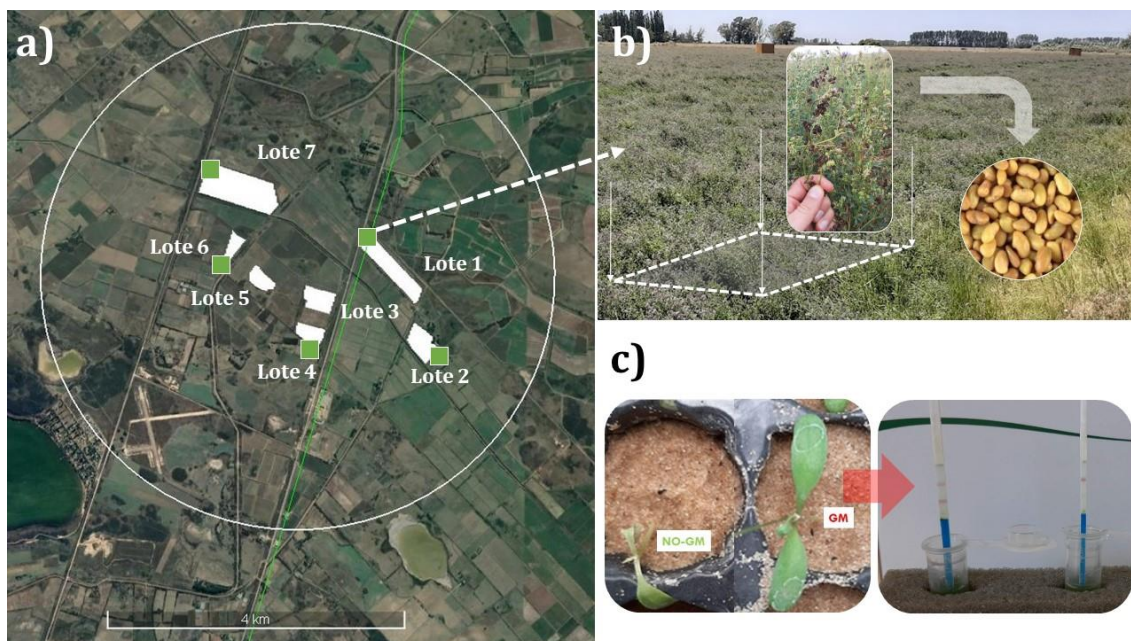


Figura 7. Ejemplo del establecimiento de un “barrio de producción” con los lotes y la distribución de las unidades de muestreo (U.M.) (a), Detalle de las U.M. dentro del lote (b), y del análisis de detección de alfalfa transgénica (GM) en laboratorio.

- 4- En caso de detectarse presencia de GM en alguna de las U.M. se procederá a la inspección de imágenes satelitales para estimar las posibles fuentes de contaminación, considerando un radio \leq a 2500 m. La distancia al posible foco de contaminación se puede estimar en función del grado de contaminación con alfalfa GM en la progenie ($> 0,01\%$) de acuerdo a la ecuación derivada de la Figura 4 [Distancia (m) $= 2590 * \exp(-0,3408 * \%FG)$]. Dentro de ese radio, los otros lotes de alfalfa se podrán detectar con los perfiles NDVI (Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada) que se asocian a un cultivo de alfalfa destinado a forraje/semilla de la región (Figura 8).

- 5- Detectados los lotes de alfalfa dentro del radio de influencia del barrio, se consultará con los propietarios correspondientes la posibilidad de que alguno de los lotes se encuentre contaminado. De ser posible se tomarán las medidas de saneamiento correspondiente en consenso con los vecinos, con el fin de salvaguardar la condición de pureza dentro del barrio.

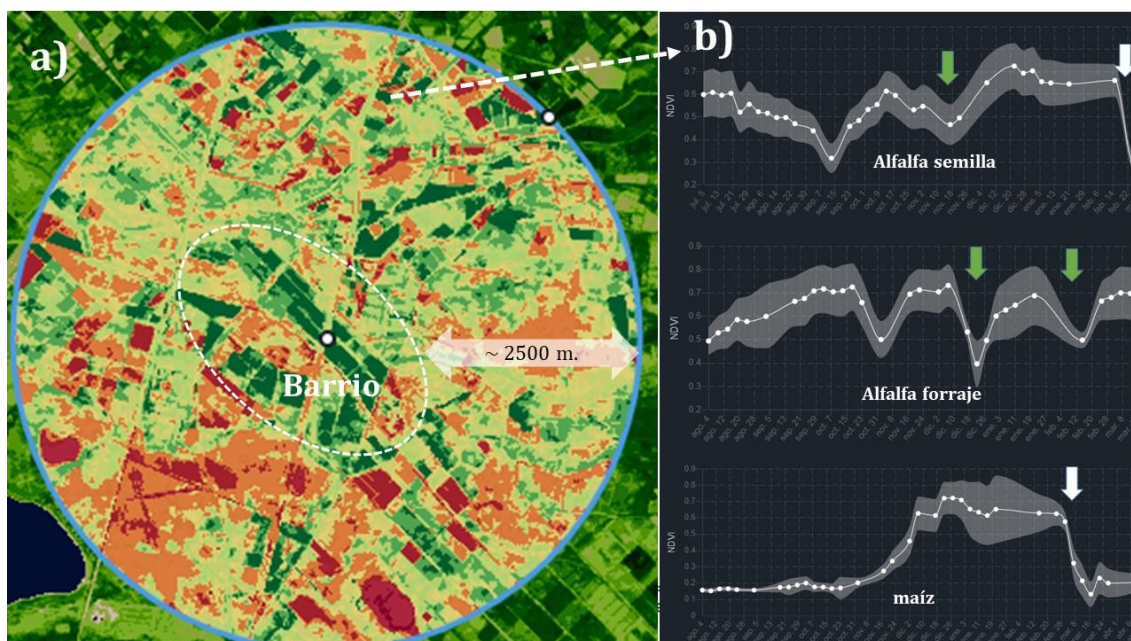


Figura 8. Ejemplo de análisis de la posible fuente de contaminación fuera del barrio de producción en un radio de 2500 m, en el caso de detectar trazas de GM en las semillas colectadas de las unidades de muestreo (U.M.) (a). Ejemplo de perfiles del índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI) en alfalfa y maíz como criterio para la clasificación de los lotes con alto NDVI en enero (b). Flecha verde en alfalfa muestra el momento de corte y flecha blanca en alfalfa/maíz el momento de cosecha.

Consideraciones finales

Las actividades realizadas en el marco del proyecto “Zona diferencial norpatagónica para la producción de alfalfa no transgénica” mostraron que en el VBRC aún persiste la presencia del transgen de alfalfa con resistencia a glifosato, tanto en las partidas procesadas como en las poblaciones ferales que se desarrollan en espacios no cultivados.

El método fenotípico/proteico específico de diagnóstico disponible en el Laboratorio de Semillas de la EEA Hilario Ascasubi puede ser empleado para asegurar la pureza de la semilla empleada para implantar los lotes para cosecha de semilla. También puede emplearse para evaluar en forma anticipada, previo a la cosecha, la presencia de contaminación mediada por polen.

En la mayoría de los establecimientos donde se produce la semilla del VBRC se requiere una acción coordinada con los vecinos y con apoyo de las instituciones del medio, para organizar barrios y así lograr condiciones que aseguren bajísimas probabilidades de aparición de contaminación con GM.

Dada la actual frecuencia de aparición de contaminantes GM, emerge la conveniencia de acordar un nivel de tolerancia, que debería ser muy exigente pero alcanzable.

Las bases establecidas en este informe pueden ser tomadas como “puntapié” inicial para la valorización de la producción local y el establecimiento de nuevos negocios productivos, que permitan salvaguardar la producción regional de semilla de alfalfa en el VBRC.

Referencias

Bagavathiannan MV, Begg GS, Gulden RH, Van Acker RC. (2012). Modelling the Dynamics of Feral Alfalfa Populations and Its Management Implications. PLoS ONE 7(6): e39440. doi: 10.1371/journal.pone.0039440.

Basigalup D. (2007). El cultivo de alfalfa en la Argentina. Ed. INTA. 479p.

Bohart GE., Nye WP. (1976). Insect Pollinators of Alfalfa Grown for Seed. In D. W. Davis (ed.) Insects and Nematodes Associated with Alfalfa in Utah. Utah Agr. Exp. Sta. Bull. 494, pp. 33-45.

Brunet J. Ziobro R. Osvatic J, Clayton MK. (2019). The effects of time, temperature and plant variety on pollen viability and its implications for gene flow risk. Plant Biology 21, 715–722. doi:10.1111/plb.12959.

Fitzpatrick S, Reisen P, McCaslin M. (2003). Pollen-mediated gene flow in alfalfa: A three-year summary of field research. Proceedings of the 2003 Central Alfalfa Improvement Conference.

Goodwin M. (2012). Pollination of Crops in Australia and New Zealand. Rural Industries Research and Development Corporation. Publication No. 12/059. 136p.

Greene SL, Kesoju SR, Martin RC, Kramer M. (2015). Occurrence of transgenic feral alfalfa (*Medicago sativa* subsp. *sativa* L.) in alfalfa seed production areas in the United States. PLoS One, 10(12), e0143296. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143296>.

Hagler JR, Mueller S, Teuber LR, Machtley SA, Van Deynze A. (2011). Foraging range of honey bees, *Apis mellifera*, in alfalfa seed production fields. *Journal of Insect Science* 11:144 available online: insectscience.org/11.144.

Keogh RC, Robinson APW, Mullins IJ. (2010). Pollination Aware: The Real Value of Pollination in Australia. Case 16: Lucerne. Rural Industries Research and Development Corporation publication 10/081, Canberra, Australia.

Kesoju SR, Greene SL, Martin RC, Kramer M, Walsh DB, Boydston RA. (2019). Isolation distances for transgenic alfalfa seed production in the Pacific Northwest. *Crop Science*, 59(4), 1701–1708. <https://doi.org/10.2135/crops ci2018.07.0414>.

Lucanera GM, Castellano AS, Barbero A. (2011-2021). Banco de datos socioeconómicos de la zona de CORFO - Río Colorado, Estimación del P.B.I. Agropecuario Regional. <http://corfo.gob.ar/desarrollo/informes-estadisticos/>.

Moschetti C, Echeverria E, Martínez E, Avalos M. (2008). Producción de semilla de alfalfa en la Argentina. Ediciones INTA. 60p.

Putnam DH. (2006). Methods to Enable Coexistence of Diverse Production Systems Involving Genetically Engineered Alfalfa. University of California Agriculture and Natural Resources Publication No. 8193. 9 pp.

Renzi JP, Reinoso O, Bruna M, Crisanti P, Rodriguez G, Cantamutto M. (2018). Producción de semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) y otras forrajeras en el Valle Bonaerense del río Colorado (p. 26) Informe Técnico N° 56. Ed. INTA.

Renzi JP, Coito C, Reinoso O, Quintana M, García F, Cantamutto MA. (2021). *Megachile rotundata* (Fab.) as a potential agro-environmental conservation strategy for alfalfa seed production in Argentina. *Journal of Applied Entomology*, 00, 1–12. <https://doi.org/10.1111/jen.12953>.

Teuber LR, Van Deynze AE, Mueller S, McCaslin M, Fitzpatrick S, Rogan G. (2004). Gene flow in alfalfa under honeybee (*Apis mellifera*) pollination. Joint Meeting of the 39th North American Alfalfa Improvement Conference and 18th Trifolium Conference. Quebec City, Canada.

Teuber LR, Mueller S, Van Deynze AE, Fitzpatrick S, Hagler J, Arias J, (2007). Seed-to-Seed and Hay-to-Seed Pollen Mediated Gene Flow in Alfalfa. Proceedings of the North Central Weed Science Society. St. Louis, Missouri.

Van Deynze, AE, Fitzpatrick S, Hammon B, McCaslin MH, Putnam DH, Teuber LR, Undersander DJ. (2008). Gene Flow in Alfalfa: Biology, Mitigation, and Potential Impact on Production. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, Iowa, USA. Special Publication N° 28, 39p.

La contaminación de las semillas de alfalfa con variedades transgénicas o genéticamente modificadas (GM) preocupa a los semilleros instalados en el Valle Bonaerense del río Colorado (VBRC). En función de los últimos diagnósticos realizados, resultará muy difícil lograr que las semillas se encuentren completamente libres de impurezas GM.

En este informe se describen las posibles fuentes de contaminación, para delinear estrategias de manejo a nivel de lote y de gestión a escala predial para evitar o minimizar la contaminación con transgenes. Se propone emplear un método de detección fenotípico/proteico específico desarrollado en el INTA Hilario Ascasubi para realizar controles de contaminación en diferentes instancias del entramado productivo-comercial.

El enfoque de organización por “barrios de producción” requiere una participación colaborativa de los actores de la cadena, pero a su vez presenta una oportunidad única para la valorización de la producción generada en la región. Se recomienda el establecimiento de umbrales de tolerancia de contaminantes GM para la producción de semilla de alfalfa convencional.

ISSN 0328-3399 Informe técnico N° 80