

## Grado en Bioloxía

### Memoria del Trabajo de Fin de Grao

**Elaboración del proyecto: Análisis del efecto de patata transgénicas en Galicia.**

**Elaboración do proxecto: Análise do efecto de patacas transxénicas en Galiza.**

**Grant development: Analysis of the effect of transgenic potato in Galicia**



# Nuria Martín Sanjuán

Junio, 2016

*Tutor(es) Académico: Andrés Martínez Lage  
Federico Pomar Barbeito*



*Asn: Andrés Martínez Lage*



*Asn: Federico Pomar Barbeito*

## ÍNDICE

RESUMEN/RESUMO (CASTELLANO/GALEGO)

SUMMARY (ENGLISH)

Palabras clave:

1. Contenido del proyecto: estado del arte de la investigación propuesta.
2. Contenido del proyecto: objetivos del proyecto.
3. Contenido del proyecto: interés para el avance del conocimiento y de la sociedad.
4. Contenido del proyecto: plan de difusión y explotación de resultados.
5. Viabilidad del proyecto: metodología.
6. Viabilidad del proyecto: plan de trabajo.
7. Estimación presupuestaria: destino de la ayuda solicitada .
8. Implicaciones éticas y/o de bioseguridad.
9. Conclusiones o hechos que se pretende alcanzar / conclusions or milestones to be achieved.

## RESUMEN

Actualmente nos encontramos en una situación de colapso del planeta como resultado de la explotación descontrolada y desconsiderada de la naturaleza llevada a cabo en los últimos siglos. Concluimos así la importancia de la renovación de las técnicas de explotación como puede ser el uso de organismos transgénicos que sean resistentes a enfermedades o que mejoren su productividad.

Las técnicas actuales destinadas al control de plagas y enfermedades de las plantaciones como son el uso de biocidas tienen importantes efectos medioambientales tanto a nivel ecosistémicos como en la reducción de biodiversidad. Obras como *La primavera silenciosa* (1962) de Rachel Carson recogen por primera vez el temor de la sociedad occidental al uso de agroquímicos como pueden ser los DDT, DDD, PCBs, etc. Así queda patente la importancia del desenvolvimiento de nuevas técnicas que sean respetuosas con el medio como puede ser la utilización de plantaciones transgénicas, alternativa disponible en la actualidad para evitar que tanto alimento sea desechado y evitando grandes pérdidas económicas.

Nuestro proyecto se centra en el uso de una patata transgénica de la variedad Desirée obtenida por Simon *et al.* 2009 resistente al mildiu o tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*, para su cultivo en el territorio gallego. Proponemos así una serie de experimentos que permitan demostrar la efectividad/ seguridad no uso de plantaciones transgénicas tanto para consumo humano como para la elaboración de los piensos destinados a la ganadería.

## RESUMO

Actualmente encontrámonos nunha situación de colapso do planeta como resultado da explotación descontrolada e desconsiderada da natureza levada a cabo nos últimos siglos. Concluimos así a importancia da renovación das técnicas de explotación como pode ser o uso de organismos transxénicos que sexan resistentes a enfermidades ou que melloren a súa produtividade.

As técnicas actuais destinadas ó control de plagas e enfermidades das plantacións como son o uso de biocidas teñen importantes efectos medioambientais tanto a nivel ecosistémicos como na redución de biodiversidade. Obras como *La primavera silenciosa* (1962) de Rachel Carson recollen por primeira vez o temor da sociedade occidental ó uso de agroquímicos como poden ser os DDT, DDD, PCBs, ect. Así queda patente a importancia do desenvolvemento de novas técnicas que sexan respetuosas co medio como pode ser a utilización de plantacións transxénicas alternativa dispoñible na actualidade para evitar que tanto alimento sexa desechado e evitando grandes pérdidas económicas.

O noso proxecto céntrase no uso dunha patata transxénica da variedade Desirée obtida por Simon *et al.* 2009 resistente ó mildiu ou tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*, para su cultivo no territorio gallego. Propoñemos así unha serie de experimentos que permitan demostrar a efectividade/seguridade no uso de plantacións transxénicas tanto para consumo humano como para a elaboración dos pensos destinados á gandería.

## SUMMARY

We are currently in a situation of collapse of the planet as a result of uncontrolled and reckless exploitation of nature carried out last centuries. Then, we conclude with the importance of the renewal of exploitation techniques as may be the use of transgenic organisms that are resistant to diseases or that are able to improve their productivity.

Current techniques focused on the control of pests and diseases of plantations, such as biocides use, have significant environmental effects, both ecosystem levels and biodiversity reduction. Pieces like Silent Spring (1962), by Rachel Carson, manifest for the first time the fear of Western society about the chemicals use like DDT, DDD, PCBs, ect. So it is clear the importance of the development of new techniques that are respectful with the environment such as the use of alternative transgenic crops, currently available to prevent discards of amounts of food and, also, to avoid huge and important economic losses.

Our project is focused on the use of a transgenic potato of Desirée variety, obtained by Simon et al. 2009, resistant to mildew which is caused by *Phytophthora infestans*, for its cultivation in Galicia. We propose a several experiments to demonstrate the effective/safe use of transgenic crops for both human consumption and the production of feed for cattle

**PALABRAS CLAVE:** Transgénico, Desirée, *Phytophthora infestans*, biocidas.

## 1. CONTENIDO DEL PROYECTO: ESTADO DEL ARTE DE INVESTIGACIÓN PROPUESTA

La patata (*Solanum tuberosum*, Linneo, 1753) fue traída desde El Perú a España, en el año 1550, por Francisco Pizarro, como una curiosidad botánica. Una vez en España se usó para alimentar a la población enferma y en poco tiempo su cultivo se generalizó, constituyendo ya a finales del s.XVI un importante alimento en países como: Alemania, Italia, Reino Unido, Polonia o Rusia (Contreras Méndez *et al.* 1999).

Su expansión más importante se produjo tras la crisis del cereal de 1768-69, su cultivo constituyó la base del desarrollo demográfico desde ese momento. A finales del siglo XVIII el cultivo de patatas, tanto en secano como en regadío, fue uno de los rasgos más destacados del paisaje agrario gallego, constituyendo sin lugar a dudas este alimento, la base para el sostenimiento de la población y de la cabaña ganadera del país, especialmente vacuno y porcino. La aparición y la generalización de su cultivo hizo que se perfeccionase enormemente el desarrollo del policultivo de subsistencia, encontrándose desde entonces y hasta hoy en día formando parte de casi todas las rotaciones de cultivo en Galicia.

Durante el Siglo XIX la patata llegó a ser el alimento básico de la población europea, que se encontraba en situación de falta de recursos siendo la patata una nueva fuente de alimento disponible para el conjunto de la población. La escasez de patata fue la causa de muerte de más de un millón de irlandeses a consecuencia del hambre, dicha escasez se produjo como resultado de la infección de los cultivos por el hongo *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary (1845), causante de la enfermedad del mildiu (Agrarios 1989).

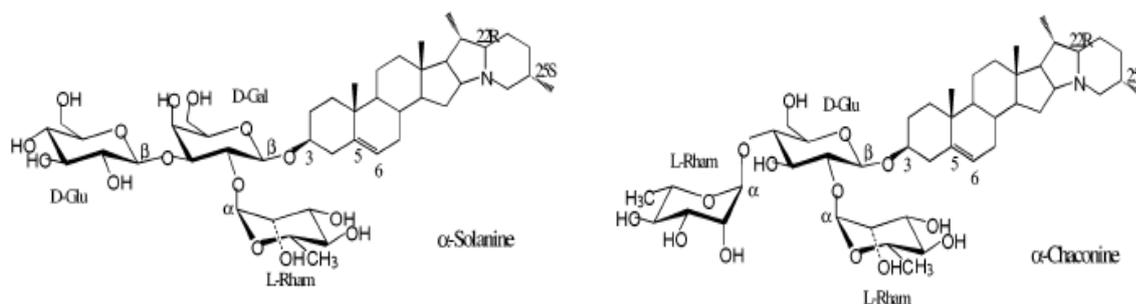
En la actualidad la patata es uno de los alimentos más importantes de la dieta mundial. Es un producto barato y con un alto valor nutritivo, que además nos permite prepararla de diferentes maneras y ofreciendo grandes posibilidades gastronómicas. Entre las características nutritivas de la patata cabe destacar:

- Elevado porcentaje de agua (75%).
- Contiene entre un 16-20% de hidratos de carbono complejos, como el almidón.
- Aunque su contenido en proteínas represente un pequeño porcentaje 2-5%, en el caso de ser consumidos con piel, su valor nutritivo en cuanto a proteínas es incluso mayor que el de los cereales.
- El contenido de grasas es casi nulo.
- Es un alimento rico en potasio, aporta fluor y es bajo en sodio.

- Posee altos niveles de la vitamina C y B6, aunque estas se degradan durante el almacenamiento y la cocción.

Así 100 gr de patata están compuestos por 77,5 gr de agua, 19 gr de hidratos de carbono en su mayoría almidón, 2,5 gr de proteínas, y 0,1 gr de grasas, aportando un total de 80 Kcal.

A pesar de su importancia como fuente de alimento no debemos pasar por alto que puede ser un alimento tóxico. Los tubérculos de patata contienen glicoalcaloides (GA), que son metabolitos naturales que protegen las plantas contra el estrés. De éstos GAs, la  $\alpha$ R-solanina y  $\alpha$ R-chaconina (Figura 1) son los más abundantes en las patatas cultivadas (Turakainen *et al.* 2004).



**Figura 1:** Estructura de  $\alpha$ R -solanina y  $\alpha$ R -chaconina. Estos tienen la misma aglicona, solanidina, pero diferentes residuos de azúcar.

Los GAs son tóxicos para mamíferos causando diversos síntomas en niveles más altos que  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal. Su toxicidad se debe a que son inhibidores de la acetilcolinesterasa por lo que su ingesta produce efectos colinérgicos. La cocción no basta para desnaturalizar la solanina ni para evitar sus efectos.

El contenido promedio de glicoalcaloides es de  $0,075 \text{ mg}$  por gramo de patata. La cantidad de tóxico depende del estado de madurez en el que se halle el fruto. En general, los GAs se sintetizan durante el desarrollo temprano del tubérculo y sus concentraciones disminuyen durante la maduración (Papathanasiou *et al.* 1998). Así dependiendo de los tratamientos que se le apliquen, del tipo de cultivo, de las condiciones de almacenamiento y de las diferencias genéticas entre las variedades podremos encontrar variaciones en el contenido de GAs. También algunos factores como la exposición a la luz, daño mecánico, el retraso en la maduración en condiciones de clima frío o algunas enfermedades, como el mildiu, pueden incrementar significativamente los niveles de GAs presentes en la planta.

### La patata en Galicia

Debido a las condiciones climatológicas, a las características de los suelos y a las esmeradas labores culturales que se dan en las subzonas productoras de patata de la Comunidad Autónoma de Galicia, el producto obtenido tiene una calidad culinaria excepcional. Este hecho, bien conocido por los almacenistas y consumidores, hace que la producción de patata gallega de calidad sea muy valorada y

tenga un precio en los mercados, tanto regional como nacional, superior respecto de las otras producciones.

En lo referente a las condiciones climatológicas, es de destacar que la abundante pluviometría de las subzonas productoras: 1.000-1500 mm/año y las temperaturas suaves, hacen que los cultivos de patata, tengan un óptimo desarrollo vegetativo, sin necesitar la aplicación de riegos, así se consigue un crecimiento continuo de los tubérculos. La existencia de un período seco en los meses de agosto y septiembre, con déficit hídrico en el suelo, hace que los tubérculos producidos pierdan agua, antes de ser cosechados, y maduren perfectamente, formándose una piel uniforme y resistente, lo que unido a la reducción del contenido de agua en el tubérculo, ayuda a la conservación del mismo y aumenta su calidad culinaria (Santos 2013).

En las zonas productoras, predominan los suelos francos y franco-arenosos, con valores de pH comprendidos entre 5 y 6,5, siendo estos óptimos para este cultivo. Esta textura permite que la piel del tubérculo sea fina y uniforme y que los tubérculos salgan limpios de la tierra. Además el pH débilmente ácido impide la presencia de ciertas enfermedades.

Respecto a los cuidados culturales, destacan las importantes estercoladuras (aplicación de estiércol/abonos) que recibe este cultivo, en torno a las 25 a 30 t/ha, siendo estas muy favorables para la gran calidad culinaria final de la patata producida bajo estas condiciones específicas.

Este conjunto de factores ha provocado que la patata de Galicia haya entrado en el Registro Europeo de Denominaciones de Origen Protegidas e Indicaciones Geográficas Protegidas. La Patata de Galicia corresponde a las patatas de consumo de variedad Kennebec cultivadas según el método tradicional. Un total de 89 productores forman parte de la Denominación de Origen, encontrándose la mayor parte de ellos en la comarca de A Limia. Algunos de ellos están adscritos también al Plan Nacional de Regadíos, que tiene como resultado una producción mayor que las tierras de secano. Es por eso que la Denominación, para mantener la calidad de los productos, estima un máximo de producción por hectáreas, que será de 22.000 quilos en el caso de las plantaciones de regadío y de 35.000 en las de secano. Además, se les exige que no se rieguen los cultivos un mes antes de la recogida, para que las patatas no hinchen por exceso de riego y que su piel no se desgaste por la humedad.

Hay que señalar que además de la variedad Kennebec en el territorio gallego se cultivan otros tipo de patata como la desireé, monalisa, spunta, agria, sante (Gómez *et al.* 2008).

### **Importancia económica de la patata a nivel nacional**

Se trata de un sector con gran segmentación en origen y destino, muy rígido en la demanda y muy volátil en la oferta, generalmente sometido a fuertes presiones especulativas en origen y excesiva estabilidad en precios de venta, los cuales, incluso ante fuertes impactos estacionales, suelen permanecer inamovibles.

El cultivo de la patata en España ocupa una superficie de 75.774 ha, con una producción de 2.467.596 tn, según datos del avance de superficies y producciones del MAGRAMA de diciembre de 2014. La importación en 2014 ascendió a 623.506 tn por un valor de 152,1 millones de euros. La producción española representa en torno al 4,2% de la producción comunitaria de patata.

En la actualidad, y según datos de 2014 del MAGRAMA, las principales comunidades autónomas productoras, son Castilla León (20.688 ha) Galicia (20.284 ha), Andalucía (11.068 ha), Región de Murcia (5.220 ha), Castilla La Mancha (2.508 ha), País Vasco (1.479 ha), y la Rioja (1.528 ha). La exportación española de patata en el año 2014 ascendió a 237.680 toneladas, por un valor de 64,5 millones de euros.

### **Posible fitopatógenos asociados al cultivo de patata**

Las condiciones climatológicas adecuadas para el cultivo de la patata también lo son para el desarrollo de enfermedades patógenas tales como el pie negro y las pudriciones blandas que son causadas principalmente por las bacterias *Erwinia carotovora* (Smith 1896). También encontramos la sarna común cuyo organismo causal es la bacteria *Streptomyces scabies* (Gussow 1892).

Existen diferentes enfermedades de origen fúngico entre las que destacan Rizoctoniasis o costra negra que es una enfermedad producida por el hongo *Rhizoctonia solani* (Kühn 1858), la sarna plateada que es una enfermedad causada por el hongo *Helminthosporium solani* A (Durieu & Mont 1849) , o el mildiu enfermedad causada por *Phytophthora infestans* y es la más seria de las enfermedades fúngicas que afectan a la patata y sobre la que nos centraremos en el presente proyecto, ya que es causante de las mayores pérdidas anuales por un valor del 20-30% en los cultivos gallegos.

Esta enfermedad fue la causante de la gran Hambruna Irlandesa en el siglo S.XIX situación provocada por la falta de alimento ocurrida en Irlanda entre los años 1845 y 1849, por lo que también es conocida como la *Irish Potato Famine*. No se registró el número de muertes provocadas por esta crisis, pero la cifra estimada se sitúa entre los 2 000 000 y los 2 500 000 de víctimas en los años posteriores a 1846. Además de a la patata esta enfermedad afecta a numerosos cultivos como: la vid, la coliflor, lechuga, cebolla, haba, tomate, pimiento...(Agrarios 1989).

Las características climáticas de Galicia hacen de nuestra tierra un lugar propicio para la plantación pero también para el desarrollo de numerosos microorganismos que provocan enfermedades como es el caso del Mildiu, dicho hongo requiere para su desarrollo temperaturas por encima de 10°C y humedad superior del 90%. Temperaturas superiores a 27-30°C suelen detener su desarrollo.

### **Mecanismo de propagación de la enfermedad**

Las esporas de este Oomicetes permanecen en los tubérculos infectados, en particular los que se quedan en el suelo después de la cosecha del año anterior y se propagan rápidamente en condiciones cálidas y húmedas. Este hecho puede tener efectos devastadores destruyendo cosechas enteras. La esporas se desarrollan en las hojas, la enfermedad ataca tanto al tallo y a las hojas de la planta como al

tubérculo, pudiendo llegar a la destrucción parcial o total del cultivo. En la hoja se producen manchas necróticas que se caracterizan por estar tapizadas por un moho blanquecino en la zona de avance de la lesión (Figura 2). Los daños en tallo se suelen producir cuando la planta es joven y no está protegida por las hojas. Las manchas son marrones, similares a las de las hojas, pudiendo llegar a afectar al diámetro completo del tallo que en ocasiones llega a romperse.



**Figura 2:** Ejemplares de patata afectadas por *Phytophthora infestans* (<http://biologos-unalm.blogspot.com.es/2014/02/papa-transgenica-resistente-la-rancha.html>)

Si las condiciones son favorables, continúa el proceso de producción de esporangios que germinan y colonizan al tejido sano. Este proceso se repite permitiendo el avance de la enfermedad. Si las esporas son arrastradas por el agua hasta los tubérculos, estos también son infectados. En el tubérculo, las lesiones adquieren consistencia corchosa de color castaño claro. En el exterior de los tubérculos se pueden apreciar acúmulos de micelio blanco (Figura 2).

Los requerimientos ambientales del hongo han hecho posible el desarrollo de modelos que permiten predecir, a partir de la recogida de datos meteorológicos, los periodos aptos para el desarrollo de la enfermedad. Así conociendo los datos de humedad y temperatura, podemos predecir el momento en que la enfermedad puede aparecer y determinar el momento óptimo para tratar. Para ello tenemos sistemas sencillos como los periodos Smith o programas informáticos más sofisticados llamados DSSs (*Decision Dupport Systems*).

### **Agricultura Transgénica**

Los avances de la Biología y la Genética moleculares permiten al hombre transferir controladamente genes entre especies vivas. Los alimentos transgénicos son producidos a partir de organismos modificados genéticamente mediante ingeniería genética. La mejora genética de las plantas mediante otros procedimientos diferentes al de la ingeniería genética se realiza de modo natural o de una manera buscada desde hace más de 10.000 años: selección de variedades de plantas, cruzamientos entre géneros distintos, etcétera. En 1994 se aprobó la primera comercialización de un alimento transgénico, un tomate en EEUU.

El auge de la agricultura transgénica se evidencia por cifras como que en el 2009 se utilizaron para estas prácticas más de 180 millones de hectáreas de 25 países y que EEUU, con más de 65 millones de hectáreas, más del 90% de las plantaciones de soja sean transgénicas, así como el 85% del algodón o el 65% del maíz. En España, en el 2010, cultivó 76.500 hectáreas (un 23,2% de las cultivadas) y es el país de la Unión Europea (UE) con más cultivos transgénicos: 80% del maíz transgénico de la UE (el 22% del total producido en nuestro país).

Los alimentos transgénicos encuentran la oposición de sectores muy importantes de la opinión pública, ecologistas, agricultores, ganaderos, asociaciones de derechos del consumidor e, incluso, algunos científicos y políticos, con preocupaciones sobre el impacto ambiental, la seguridad alimentaria, los cambios culturales o las dependencias económicas (patentes). Los políticos son sensibles a ello y la presencia de distintos colectivos hace que el único cultivo autorizado en la UE sea el maíz Bt.

Recientemente, en la sede del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAAMA), se celebraron las jornadas de Biotecnología y su contribución a una Agricultura Sostenible con una ponencia magistral de Peter J. Davies, profesor estadounidense experto de Fisiología Vegetal. En su intervención resaltó la importancia de los cultivos transgénicos en la producción de alimentos para hacer frente al reto de conseguir un 70% más de alimentos en los próximos 38 años para poder alimentar a los más de 9.500 millones de habitantes que poblarán el planeta en 2050, afirmando que no existe evidencia científica alguna de que los cultivos y alimentos modificados genéticamente tengan riesgos diferentes a los convencionales (Lozano 2012).

La tecnología de la ingeniería genética promete cambios revolucionarios en los alimentos transgénicos y conseguir objetivos como: mejoras en la agricultura, mejora de la calidad de producto, producción de nuevos compuestos, plantas con nuevas aplicaciones, aunque también presentan ciertos riesgos potenciales como pueden ser los riesgos medioambientales, riesgos para la salud y presenta un gran impacto social, económico y comercial.

Tener en cuenta que si bien el uso de la ingeniería genética en la agricultura puede aumentar la producción, pero también puede reducir el desempleo (Mamani *et al.* 2012).

#### BIBLIOGRAFIA:

Agrarios G. 1989. Fitopatología. (2ª ed). Limusa, México.

Alvarado M., Andújar M.E., Durán JM., Flores R., Montes F., Morera B., Muñoz C., Ortega M.G., Páez J.I., Rosa A., Sánchez A. M., Serrano A. & Vega J.M. 2010. Plagas y enfermedades de la patata. Departamento de Sanidad Vegetal de la Junta de Andalucía.

Consejo Regulador de la I.G. Patata de Galicia. Denominaciones de Origen e Indicaciones Geográficas protegidas. Disponible en: [http://www.infoagro.com/Denominaciones/denominacion\\_origen.asp?id=236&idp=34&p=11](http://www.infoagro.com/Denominaciones/denominacion_origen.asp?id=236&idp=34&p=11) & Patata%20de%20Galicia Hortalizas. Consultado el 20/12/2015.

- Contreras Méndez A. 1999. Antecedentes sobre el origen de la papa. Revista de la Papa 1, 2-3.
- Corral M.G. Secuencian el genoma del mayor enemigo de la papa, El Mundo, 11 de septiembre de 2009.
- Dowley L.J. 1995. Proceedings of Workshop on the European network for development of an integrate control strategy of potato late blight. 1996-2013. Ed. European Association for Potato Research (EAPR).
- Dpto. de Agricultura de COAG. 2009. Informe de situación del sector de la patata en España. Madrid. COAG. Disponible en: <http://www.ceaccu.org/wpcontent/uploads/2009/09/0849bca3fdc224114efdd7a7965393aa.Consultado el 15/01/2016>. Consultado el 20/12/1015
- Estudio de la cadena de valor y formación de precios de la patata fresca de consumo. 2010. Ministerio de medio ambiente rural y marino. Observatorio del precio de los alimentos MARM. Disponible en: [http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/servicios/observatorio-de-precios-de-los-alimentos/ESTUDIO\\_PATATA\\_14112010\\_tcm7-182793.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/servicios/observatorio-de-precios-de-los-alimentos/ESTUDIO_PATATA_14112010_tcm7-182793.pdf). Consultado el: 06-10-2015.
- Fry W. 2007. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. Mol. Plant Pathol. 9, 385–402.
- Guerra, J.P. 1983. Breve reseña histórica del cultivo de la papa en Cuba. En: II Curso Intensivo sobre el cultivo de la papa: Diferentes temas sobre el cultivo de la papa. La Habana: Ministerio de la Agricultura. 1-13.
- Jerez A.E. El hongo del mildiu hace estragos en el viñedo del Marco de Jerez. Diario de Jerez. Disponible en: <http://www.diariodejerez.es/article/jerez/2302227/hongo/mildiu/hace/estragos/vinedo/marco/jerez.html>. Consultado el 08/06/2016
- Kirk W., Wharton P., Hammerschmidt R., Abu-El Samen F., & Douches D. 2004. Late Blight. Michigan. Potato Diseases. Extension Bulletin E-29445.
- Lozano Teruel J.A. 2012. Agricultura ecológica y transgénica ¿incompatibles?. Ciencia y Salud. Disponible en: <http://cienciaysalud.laverdad.es/la-alimentacion/tecnologias-adiciones-modificaciones/agricultura-transgenica-agricultura-ecologica-incompatibles-article.html>. Consultado el 20-03-2016.
- Mamani M., Salazar A., & Yncio K. 2012. Aspectos éticos y políticos de los alimentos transgénicos. Universidad Nacional Cajamarca.
- Medina, Y.E. *Phytophthora*: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control. 2014. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical.
- Moraleda Quilez F. 2004. Estudio sobre la comercialización agroalimentaria en el sector cooperativo español: Caracterización del mercado y de la comercialización de la patata en las cooperativas agrarias. Confederación Española de Cooperativas Agrarias de España (CCA) para el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Moreiras O., Carbajal A., Cabrera L. & Cuadrado C. 2013. Tablas de composición de alimentos. Ed Pirámide, 16º ed. revisada y ampliada. Madrid.
- Papathanasiou F., Mitchell S. & Harvey B. 1998. Glycoalkaloid accumulation during tuber development of early potato cultivars. Potato Res. 41, 117-125.
- Peksa A., Golubowska G., Lisinska G. & Aniolowski K. 2008. Influence of harvest date on glycoalkaloid contents of three potato varieties. Food Chem. 78, 313-317.
- Ruiz de Galarreta J.I., De Rios D.J. (Eds). 2008. Variedades de patatas y papas españolas. Ed Neiker. Vitoria Gasteiz. 192 pp.

Santos L. 2013. La producción de patata en Galicia descenderá en 15 millones de kilos. Disponible en: <http://www.farodevigo.es/portada-ourense/2013/08/27/produccion-patata-galicia-descendera-15/866878.html>. Consulta el 13-04-2016.

Turakainen M., Väänänen T., Kanttila K., Ollilainen V., Hartikainen H & Seppänen, M. 2004. Effect of selenate supplementation on glycoalkaloid content of potato (*Solanum tuberosum* L.). J. Agric. Chem. 52, 7139-7143.

Zwankhuizen M.J., Govers F., Zadoks J.C. 1998. Development of potato late blight epidemics: Disease foci, disease gradients, and infection sources. Phytopathology, 88: 754-763.

## 2. CONTENIDO DEL PROYECTO: OBJETIVOS DEL PROYECTO

Aspectos generales a estudiar sobre el posible efecto de la patata transgénica en el medio así como en la salud humana.

El conjunto de experimentos realizados durante el desarrollo del presente proyecto será tratado siempre con la cautela necesaria teniendo en consideración que trabajamos con organismos transgénicos.

Determinación de la alergenicidad potencial de las proteínas de las patata transgénica, el estudio se basará en la complementariedad de las secuencias codificadas por las plantas transgénicas y no transgénicas con las secuencias clasificadas como alergénicas en las bases de datos.

Valoración de los posibles efectos del cultivo de nuestra patata sobre otros organismos o sobre la composición físico-química, en la cubierta edáfica o bien en la rizosfera de plantaciones de patata silvestre y de patata transgénica. Se determinarán ciertos parámetros del suelo como son el pH, y los elementos disponibles. El análisis del efecto sobre organismos es muy sencillo ya que se realizará mediante el recuento de UFC en cultivos celulares.

Comparación del valor nutritivo de la patata transgénica y silvestre, este estudio se basará en la realización de:

- Valoración nutricional del contenido proteico.
- Determinación del contenido en fibra.
- Determinación del valor calorífico, mediante el uso de una bomba calorífica.
- Valoración del potencial tóxico.

4) Estimación de la capacidad de hibridación de nuestro OMG con organismos silvestres de la variedad Desirée en plantaciones controladas.

### **3. CONTIDO DEL PROYECTO: INTERÉS PARA EL AVANCE DEL CONOCIMIENTO Y DE LA SOCIEDAD.**

El mildiu es la enfermedad que más pérdidas causa a nivel mundial en el cultivo de la patata (causa hasta un 30% de pérdidas anuales) y es por ello que se están haciendo grandes esfuerzos por controlar su desarrollo.

La tendencia actual es realizar un control integrado de la enfermedad mediante la combinación de sistemas de predicción y con el desarrollo de fungicidas que eviten su aparición o minimicen los daños.

En la actualidad el mercado ofrece productos de control químico, que consisten en la utilización de productos capaces de prevenir o controlar la posterior infección. Los productos usados para controlar el mildiu son clasificados como de contacto o sistémicos. Los distintos productos nos permiten realizar un control de la plaga en función de su estado de desarrollo. Entre los fungicidas de contacto o preventivos más importantes se encuentran los cúpricos y los ditiocarbamatos, que actúan sobre la superficie de la planta, evitando la germinación y penetración de los esporangios, disminuyendo las fuentes iniciales de la enfermedad. Por otra parte los entre fungicidas sistémicos los más conocidos se encuentran las fenilamidas, acetamidas, carbamatos fosfonatos, y otros que tienen la capacidad de proteger las hojas producidas después de la aplicación. Su efecto se debe a que inhiben algunas o varias etapas específicas del metabolismo del patógeno. Hay que señalar que el uso continuo de estos productos ha generado la aparición de cepas resistentes.

Aunque los biocidas nos permiten controlar las enfermedades también pueden ocasionar los siguientes problemas como pueden ser :

Interferencia en el equilibrio ecológico al dañar especies no relacionadas debido a la baja especificidad de los productos empleados. Entran en la cadena alimentaria a través de los consumidores de primer orden como son los herbívoros, y luego causan daños a las personas. Podrían ocasionar daños en la salud de los seres humanos como intoxicaciones o dermatitis, cuando se consumen vegetales que han sido irrigados por biocida. Contribuyen a la contaminación del agua, cuando se infiltran hacia aguas subterráneas que surten a ríos y lagos.

Además de los numerosos daños medioambientales como ya hemos comentado los últimos años la eficacia de los tratamientos ha ido descendiendo debido a la aparición de cepas resistentes por el hongo a los fungicidas generándose así la necesidad de producir fungicidas de mayor toxicidad.

Es necesaria la aplicación de técnicas innovadoras que nos permitan el desarrollo de una nueva agricultura respetuosa con el medio. Una posible solución es el uso de plantaciones de patata *Desirée* transgénicas resistentes al mildiu, cuyo mecanismo de resistencia se basa en la inhibición de la señalización intracelular. A diferencia de otros transgénicos cuyo mecanismo de control de la

infección consiste en la secreción de factores antibióticos nuestro organismo no secreta ningún producto al medio por lo que su impacto medioambiental sería mínimo.

En cuanto a la opinión pública investigaciones demoscópicas más reciente ha confirmado que el rechazo de los ciudadanos y ciudadanas europeos a los transgénicos aumenta cada vez más. Es interesante observar que también en EEUU, a medida que se aviva el debate sobre la ingeniería genética y la gente se informa más, de desconfianza crece.

La situación actual de la desconfianza puede haberse promovido por malas publicidades o falsas publicaciones como fue el conocido caso del trabajo de Seralini en 2012 posteriormente retractado sobre la toxicidad a largo plazo de un herbicida Roundup, han provocado un gran impacto mediático desarrollándose un rechazo generalizado hacia los productos transgénicos, dicha situación ha alcanzado las más altas esferas, ya que los europarlamentarios han reconocido públicamente que una mayoría absoluta de la población presenta rechazo frente a dichos productos.

Así se han desarrollado una serie de mitos sobre los organismos transgénicos como los recogidos en *Deshaciendo los mitos: verdades sobre la biotecnología agraria y la alimentación biotecnológica* es una actualización del artículo *Corrigiendo los mitos* publicado en 2003 por la Asociación Americana para la Soja y otras ocho importantes organizaciones agrarias de EE.UU.

En cuanto a la propuesta que deseamos realizar deberá regirse de acuerdo a la legislación vigente entorno a los transgénicos en el ámbito europeo, acción que se estará regulada por el comité ético de la UDC.

#### **4. CONTENIDO DEL PROYECTO: PLAN DE DIFUSIÓN Y EXPLOTACIÓN DE RESULTADOS**

La difusión de los resultados de índole científico-técnica, de divulgación y de interés para la industria, que vayan emergiendo del proyecto se realizarán por cinco vías principales:

1) Comunicaciones a Congresos, Simposiums y Workshops de índole nacional e internacional, como pueden ser los congresos nacionales de la SEFV (Sociedad Española de Fisiología Vegetal), de la SECH (Sociedad Española de Ciencias Hortícolas), la Sociedad Española de Mejora Genética Vegetal o los congresos internacionales de la Sociedad Europea de Biología Vegetal (FESPB) o de la European Plant Science Organisation (EPSO).

2) Artículos de divulgación en revistas con poco impacto científico, no recogidas en el JCR, pero con difusión en el sector hortícola español, como son Horticultura Internacional, Agricultura-Revista Agropecuaria, Horticom News, A Terra, etc). Charlas en las cooperativas agrarias gallegas en colaboración con la Xunta de Galicia para dar a conocer los resultados obtenidos.

3) Publicación de artículos originales de investigación en revistas recogidas en el JCR en la sección de “Agronomy” o “Plant Sciences” en el primer cuartil del índice de impacto.

4) Asimismo, como parte importante de los objetivos de difusión y divulgación de este proyecto, todos los avances del conocimiento surgidos de la presente investigación y la posible apertura de nuevas estrategias metodológicas quedarán disponibles y serán transferidos a cualquier empresa interesada y al público en general a través de la oficina OTRI de la Universidade da Coruña.

De acuerdo a la ley de la Ciencia los resultados serán publicados en Open Access y en su defecto se publicará en el RUC de la UDC.

5) Creación de páginas webs donde se publicarán los resultados y realización de conferencias divulgativas. Así como la comunicación al gobierno central y comunidades autónomas de los resultados obtenidos.

## **5. VIABILIDAD DEL PROYECTO: METODOLOGÍA.**

### **Estudios previos necesarios para la obtención del material vegetal.**

Nuestro proyecto se centra en la posible aplicación de un organismo genéticamente modificado (GM) como es *Solanum tuberosum* L. resistente al tizón mediante la inserción del gen RPI-vnt1.1, aislado de un pariente silvestre de la papa, *Solanum venturii* Hawkes & Hjert 1960, introducido por métodos transgénicos en la variedad de patata Desirée a través de un vector p-IndigoBAC-5 (EpiCentre Biotechnologies, Madison, WI, U.S.A.) Dicho transgénico fue creado por Foster, *et al.* (2009), mediante la inserción de genes de resistencia R que han desarrollado de mecanismos de reconocimiento por parte de la planta de efectores específicos producidos por los hongos durante el proceso de infección, ya sea directamente o indirectamente. Este reconocimiento es generalmente mediado por receptores intracelular codificados por genes de resistencia a enfermedades (R).

Debido al proceso de coevolución sufrido por parte del sistema planta-patógeno, los genes R que han sufrido variaciones recientes imponen selección en razas de patógenos reconocidos para las mutaciones en los efectores que se traducen en la evasión de la detección.

En nuestro proyecto se propone el estudio detallado de los principales problemas asociados al uso de transgénicos. Así el estudio se realizará mediante de pruebas experimentales de campo y de laboratorio, respetando siempre la legislación vigente a nivel europeo y español que establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización OMGs.

Una vez obtenido el material vegetal transgénico es necesario su cultivo, que será realizado en el centro de investigaciones agrarias de Mabegongo (CIAM).

Se realizarán plantaciones controladas tanto de individuos transgénicos como los no transgénicos. Los posteriores estudios se realizaran en los laboratorios del equipo de investigación de la UDC.

## Análisis de la alérgenicidad

La importancia de las enfermedades alérgicas (EEAA) radica en su propia naturaleza. Son procesos muy frecuentes, la OMS ha clasificado las EEAA entre las seis patologías más frecuentes del mundo. Se estima que pueden afectar al 20% de la población mundial, y resultan más afectados los países desarrollados e industrializados que el resto. Afectan en especial a niños y personas jóvenes, en las fases de sus vidas en las que la producción laboral o académica es más intensa.

Las consecuencias socioeconómicas de todos estos aspectos son muy importantes y muy superiores a las que hace solo unas cuantas décadas se les atribuía.

La tendencia al crecimiento paulatino en la frecuencia de las EEAA ha sido una constante en las últimas cuatro o cinco décadas, con cierta aproximación al estancamiento en los últimos años, aunque solo en los países desarrollados. Este fenómeno se ha hecho especialmente patente en los procesos mejor estudiados, como la dermatitis atópica, la rinitis alérgica y el asma bronquial.

El aumento de la frecuencia ha ido parejo a un incremento en la complejidad, como se ha observado en la presencia casi cotidiana de la coexistencia de alergias alimentaria y respiratoria en un mismo paciente. Todas estas circunstancias han despertado la inquietud de los investigadores y han motivado que las publicaciones científicas relacionadas con las EEAA se hayan multiplicado de forma espectacular en las últimas décadas. El estudio se realizará basándose en la comparativa de secuencias siguiendo el protocolo descrito por Kleter y Peijnenburg (2002).

Los algoritmos disponibles para predecir la antigenicidad, es decir, la unión del anticuerpo, de secuencias de péptidos se utilizan en, por ejemplo, el diseño de vacunas de péptidos. Un algoritmo empleado comúnmente es el de Hopp y Woods, en el que la antigenicidad de un punto en la secuencia de la proteína se determina promediando los valores de antigenicidad de este punto y los aminoácidos que flanquean este punto.

Hasta el momento no se dispone de un método consensuado. Sin embargo, se han recomendado estudios químicos, proteómicos y de huella digital de la expresión génica a nivel de mRNA, caso por caso, con el fin de determinar diferencias en la expresión total de proteínas de la planta transgénica y la convencional.

La presunción de alérgenicidad de una proteína se fundamenta en al menos una similitud de seis a ocho aminoácidos contiguos idénticos o químicamente relacionados, entre la proteína examinada. También se presume alérgenicidad potencial si en una secuencia de 80 aminoácidos se presenta una similitud mayor de 35% (Chakraborty *et al.* 2000). Con propósitos de predicción, se compara la secuencia de aminoácidos de la proteína transgénica con secuencias conocidas de proteínas con epítopes alérgicos.

Es obvio que la ausencia de homología de secuencias no es demostrativa de ausencia de alergenicidad, ya que todos los alérgenos no se encuentran caracterizados y no todos son conocidos en su secuencia de aminoácidos.

Sin embargo, la mayoría de los alérgenos de plantas pertenecen a unas pocas familias de proteínas que presentan secuencias de aminoácidos altamente conservadas.

La susceptibilidad genética juega un importante papel en el desarrollo de la respuesta alérgica a los alimentos aunque los factores genéticos no se han elucidado aun (Kleter 2002).

Así en primer lugar, se obtendrán las secuencias de epítomos lineales de la literatura en una proteína alergénica en particular y en comparación con los tramos idénticos que esta proteína tiene en común con una proteína transgénica. A continuación se determinará la secuencia de la proteína, mediante el uso de la herramienta BLASTX del NCBI.

([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=&LINK\\_LOC=blasttab&LAST\\_PAGE=blastp](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastp))

La alineación de las secuencias transgénicas con secuencias de proteínas alergénicas se llevará a cabo con la herramienta BLAST de la pagina del NCBI que nos permite buscar `secuencias cortas casi exactas': <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, hay que considerar la limitación en el alineamiento ya que consultaremos las secuencias de `alérgenos' contenidas en las bases de datos.

Para determinar de antigenicidad, se realizará una predicción del sitio más antigénico de la proteína mediante el uso de un algoritmo informático. Posteriormente, se verificará si este sitio antigénico coincide con la secuencia que la proteína transgénica y la proteína alergénica tienen en común.

Las bases de datos que podemos consultar para conocer la alergenicidad de una proteína traducida una vez que conocemos su secuencia son: Agmobiol, CSL, All Protein, Farrp, All Protein, NCFST, Protall.

Los rangos de predicción de antigenicidad se crearán con la interfaz gráfica en la página web de la Universidad del Estado de Colorado, Expasy, Wezman Institute para las secuencias de la proteína transgénica y la proteína alergénica que comparten los péptidos idénticos de acuerdo con el método de Hopp y Woods, utilizando una similaridad de secuencia de seis aminoácidos .

Los resultados positivos necesitarán de la realización de comprobaciones adicionales mediante ensayos de unión a IgE ya que los sitios antigénicos no son necesariamente alergénicos.

## **Determinación del posible efecto del transgénico sobre las características del suelo:**

### **Valoración de características físico-químicas de los suelos**

Para realizar dicha valoración realizaremos una determinación del pH, con el fin de comparar los datos pre y post cultivo tanto de plantaciones transgénicas como silvestres. El desarrollo de este objetivo se desarrollará principalmente en el CIAM.

De acuerdo a la legislación vigente en cuanto a la liberación de organismos transgénicos en medio natural, y teniendo en consideración la naturaleza del organismo a tratar y la facilidad de expansión será necesario tomar todas medidas necesarias para evitar la posible expansión y/ o contaminación.

Las plantaciones se realizarán en invernaderos de 1000m<sup>2</sup> con doble puerta de seguridad, y cualquier material que sea empleado en el interior de dichas instalaciones deberá ser tratado con el fin de desinfectarlo.

Las muestras serán obtenidas del suelo mediante la utilización de un sacabocados (cilindro metálico de 2,5 cm de radio y 5 cm de altura) a varias profundidades del suelo. En general, son recomendables las siguientes profundidades como mínimo:

- Superficial, aproximadamente de 0-20 cm.
- Zona intermedia del perfil de suelo, aproximadamente de 20-50 cm.
- Zona profunda del perfil, aproximadamente >50 cm.

Las muestras previas al cultivo serán tomadas aleatoriamente en el área de la parcela, mientras que para el estudio de los suelos cultivados con patata tanto transgénica como no transgénica se tomarán las muestras de la zonas más próxima a las raíces (rizosfera) con el fin de medir variaciones en el suelo como resultado de las exudaciones radicales.

Se tomarán las muestras en los distintos años (previo cultivo 1º año, post cultivo 1º año, previo cultivo 2º año, post cultivo 2º año) lo que nos permitirá hacer ciertas predicciones a largo plazo.

Una vez obtenido el material de partida lo tamizaremos a través de un tamiz de malla amplia (15 mm), para eliminar piedras y restos vegetales e interrumpir gran agregados del suelo, y luego se tamiza a través de un tamiz de 5 mm. El suelo tamizado se mezcla a fondo y se mantiene húmedo a 24° – 28°C.

Para poder realizar los estudios es necesario conocer ciertos parámetros del terreno para lo que realizaremos:

Determinación del pH en agua y en solución de KCl en proporción 1:2,5 (Guitián y Carballas 1976; Carmago *et al.* 1986), midiendo la variación del potencial en un electrodo de vidrio con la variación de la actividad hidrogeniónica de la solución en que está embebido.

Para ello, transferiremos 10gr de suelo tamizado a un vaso de precipitados, adicionando para la determinación en agua, 25 mL de agua destilada. Esta mezcla se remueve hasta obtener una pasta

fluida y dejándolo reposar unos 10 min para permitir la estabilización. Para la medida en medio con KCl (0,1 N) tras añadir los 25 mL de dicha disolución se esperará una hora antes de realizar la medida con el pHmetro. Cabe destacar que en las disoluciones 1: 2,5 es imprescindible la agitación durante la medida debido al efecto “pallmann”, que hace que el pH del líquido sobrenadante sea superior al de la suspensión agitada.

Una vez realizada la valoración del pH, realizamos el análisis de los elementos disponibles en la cubierta edáfica. Para ello se evaluará el status nutritivo del suelo y/o el contenido en metales pesados fácilmente movilizables, se llevaran a cabo la extracción con el agente quelante ácido dietitlenotriaminopentaacético (DTPA) que está entre los más eficaces para evaluar la disponibilidad de micronutrientes y metales pesados en muestras de suelo.

La extracción con agente quelante DTPA  $0,005 \text{ molL}^{-1}$  en agua destilada, es aplicada en un rango de pH desde ácido a básico (SPAC, 1992). Así agitaremos primero manualmente y posteriormente con un agitador para agilizar la disolución. Se adicionarán 60 mL de trietanolamina (TEA) y 5,88 g de  $\text{CaCl}_2$  y se transferirá todo el contenido en un matraz de 4 L que enrasaremos con agua. Posteriormente, corregiremos el pH de la disolución con HCl 6N hasta alcanzar el valor de pH de 7,3. Para realizar la extracción, se tomaran 20 cm<sup>3</sup> de TFSA en frascos de polietileno, se adicionarán 20 mL de la disolución extractora mediante dispensador, se tapan los frascos, y se colocan en bandejas de aluminio con capacidad para 30 frascos y se agitaran durante 2 horas con rotación a 240 r.p.m en agitador circular horizontal.

Pasado el tiempo, se filtrará la suspensión, con papel de filtro Whatman nº41 y en el filtrado se determinará el Fe, Mn, Cu, Zn, Pb, Ni, Cr, Cd mediante espectrómetro de emisión atómica, ICP- AES, modelo Jobin Yvon JY 50-P.

Para el tratamiento de los datos se llevará a cabo un análisis de las series de datos obtenidas en las distintas muestras (antes de la plantación del 1º año, después de la recolección 1º año, antes de la plantación del 2º año y posteriormente a la recolección del segundo año), cada una de estas muestras se realizará por duplicado ya que estudiamos plantaciones de patata Desirée salvaje y plantaciones de patata transgénica.

Calcularemos parámetros estadísticos como media, mediana, desviación estándar, coeficiente de variación, máximos y mínimos.

Con frecuencia, se realizarán ajustes de tipo lineal para calcular el coeficiente de correlación entre elementos totales o extraídos de DTPA, al tiempo que se establece, mediante correlación, el grado de dependencia entre elementos estudiados y las propiedades generales del suelo.

El nivel de significación de los resultados del análisis de regresión se evaluó a partir del número de datos de cada elemento o propiedad estudiada y el valor del coeficiente de correlación según los procedimientos descritos por Lamote, (1981).

### **Estudio del efecto de nuestro organismos transgénico sobre microorganismos presentes en la cubierta edáfica.**

Tomaremos una muestra de suelo a partir de los diversos tratamientos y se suspenden en agua estéril a una concentración final de 0,1 gr/mL y se realizan 10 diluciones en serie. El UFC de bacterias cultivables se estimara en función de la SEA (Stotzky *et al.* 1993) mediante la siembra de 100 µl de las muestras diluidas en placas de agar y se incuban a  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 5 días.

El UFC de actinomicetos se determinará mediante la disección de las colonias con una aguja. Si la colonia se mantiene como una discreta, pequeña masa, se considera que es un actinomiceto, mientras que si la colonia aparece manchada y con bordes rugosos, se considerará como una bacteria. Dichas observaciones empíricas se confirmarán mediante el examen al microscópico de las colonias.

Las UFC de hongos se estimarán un medio agar Rosa Bengal-estreptomicina (Stotzky *et al.* 1993) en la que 100 ml de muestra de suelo diluido será cultivado a partir de 10 diluciones seriadas. El recuento de las UFC se realizará después de la incubación durante  $5\pm 7$  días a  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ . En nuestro caso se realizarán cinco medidas de dicho recuento para cada una de las muestras de suelo: a) Antes de cultivar 1º año; b y c) Después de recolectar 1º y 2º año de las plantaciones transgénicas; d y e) Después de recolectar 1º y 2º año de las plantaciones no transgénicas (control).

### **Efectos sobre la eficiencia en la cadena trófica, valor nutritivo**

Valoración nutricional basado en análisis bioquímico:

Realizaremos una extracción de proteínas. La proteína soluble se extraerá de 250 mg de tejido de tubérculos transgénicos/y no transgénicos en 0,5 ml de tampón de extracción (Trisacetato mM 25, pH 8.5 y 0.5 M NaCl y 5 PMSF mM). Tras homogeneizarlo se centrifugará a 12.000 g durante 10 minutos. La concentración de proteína en el sobrenadante se medirá usando el kit de ensayo de proteínas de Bradford (Bio-Rad), siguiendo las indicaciones descritas por fabricante, usando seroalbúmina bovina (BSA) como patrón.

A continuación se realizará un análisis de aminoácidos. La composición de aminoácidos de las proteínas obtenidas de tubérculos no modificados y transgénicos se determinará mediante el uso de un analizador de aminoácidos Pico Tag online (Waters).

Para ello la proteína soluble total de los tubérculos transgénicos y los salvajes se precipitará con ácido tricloroacético al 10% manteniendo la muestra frías en hielo durante 45 min, y se lavará con etanol y éter (1:1), tras lo cual y se liofilizará. A continuación se realizará la hidrólisis ácida y la derivatización de la proteína liofilizada con isotiocianato de fenilo (PITC) de acuerdo con el manual pico tag.

Los derivados PITC de cada aminoácido serán separados usando una columna cromatográfica de HPLC C18 y detectados por absorbancia a 254 nm. Los diferentes aminoácidos se determinarán comparando su comportamiento cromatográfico y espectrofotométrico con estándares comerciales.

### **Determinación del contenido en fibra**

Para determinar el contenido de fibra se usará el método AOAC 991.43 "total, fibra dietética soluble e insoluble en los Alimentos". Este método permite determinar el contenido de fibra dietética soluble e insoluble y total en los alimentos procesados y materias primas, tales como productos de cereales, frutas y verduras.

Brevemente las muestras de 1 gr de patata liofilizada se someterán a digestión enzimática secuencial con  $\alpha$ -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa termoestables, y tras una filtración y lavados sucesivos con agua caliente los filtrados se precipitarán con etanol al 95% y se pesarán determinando la fibra dietética soluble (SDF). Por su parte los residuos de los filtrados anteriores se secan y se pesan obteniéndose así la FDI.

### **Estimación del valor calorífico**

Para estimar el valor calorífico de las muestras de patata silvestres y transgénica se usará una bomba calorimétrica. Para ello tomamos 1000 gr de patata liofilizada que se compactan formando un cilindro, incorporando en su interior una pequeña espira de alambre de resistencia para iniciar la combustión. Una vez cerrada la cámara herméticamente se incorporará oxígeno a una presión de 25 kg / cm<sup>2</sup>. Tras añadir una cantidad fija de agua y determinar su temperatura inicial, se inicia el proceso de combustión determinando periódicamente la temperatura hasta alcanzar el máximo. Para determinar la constante del calorímetro se usará ácido benzoico como patrón.

Finalmente la cantidad de calor generada por la sustancia alimenticia en calorías % se calculará aplicando la fórmula siguiente:

$$\text{Calorías / 100 gr} = (\text{mw} \times \text{cw} + \text{mc} \times \text{cc}) (\text{t2} - \text{t1}) \cdot 100 / \text{P}$$

Donde: **mw** es la masa de agua del calorímetro, **cw** es la capacidad calorífica del agua, **mc.cc** es la constante del calorímetro, **t2** es la temperatura final, **t1** es la temperatura inicial, **P** es el peso de la muestra.

### **Estudio de la presencia de glicoalcaloides tóxicos**

La extracción de glicoalcaloides se iniciará con el homogenizado de 10 gr de patata liofilizada con 60 ml de ácido acético al 5%, a continuación esta suspensión será sometida a ultrasonidos durante 5

minutos, tras ser centrifugada durante 10 min a 3000g se repetirá la extracción con ácido acético en el precipitado. Finalmente y tras una segunda centrifugación los dos sobrenadantes serán filtrados a través de filtros de 0,45µm y almacenados a 4°C hasta su análisis.

La identificación y cuantificación de los diferentes glicoalcaloides se realizará mediante cromatografía líquida usando una columna de fase reversa C18 (Waters sunfire 150mm x 4,6 mm, 5 µm) acoplada a un sistema cromatográfico Waters alliance dotado de un detector de diodos. La temperatura de la columna será de 35°C y el método cromatográfico será un gradiente usando como solvente A buffer TEAP y como solvente B acetonitrilo (ACN) con las siguientes etapas: t=0, ACN 20%; t=12 min, ACN 25%; t=15 min, 35%; t=17 min, 45%; t=25, 65%.

El volumen de inyección de 10µl y los glicoalcaloides serán identificados y cuantificados comparando con patrones comerciales.

### **Valoración de la capacidad de hibridación de nuestro organismo transgénico con variedades silvestres:**

Estudio experimental in vivo en el cual se realizará una plantación controlada de nuestro MO e individuos salvajes de patata Desireé bajo condiciones aisladas y controladas de invernadero.

Se deberá tener en consideración la necesidad de tomar mayores medidas de precaución con el fin de evitar las posibles contaminaciones al exterior.

El estudio se realizaría mediante la plantación del transgénico en un área determinada y rodeado por individuos salvajes. La parcela ocupada por nuestras plantas transgénicas se encontraría en un área de 5mx5m en un extremo del invernadero el resto del mismo estará cultivado con plantas no transgénicas. La recogida de muestras se realizará pasados los períodos de floración (mes de septiembre-octubre) se recogerán muestras representativas de semillas de plantas a distintas distancias de los individuos transgénicos 5, 15 y 40 m.

Se obtendrá el ADN genómico de las semillas de cada muestra, según el método CTAB (Doyle y Doyle, 1987). Se evaluará la calidad del ADN en geles de agarosa y las concentraciones de ADN serán determinadas con un espectrofotómetro NanoDrop ND -1000. Las concentraciones de ADN finales serán ajustadas a 25 ng/L y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Se diseñarán primers específicos para el transgén usando el software Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Se optimizarán las condiciones de PCR respecto a la temperatura de hibridación de los primers, (termociclador). Se comprobará la presencia o no de la banda derivada del transgén mediante electroforesis en agarosa al 1%, acoplada a tinción con SYBR green.

## BIBLIOGRAFIA:

- Acosta O., Guerrero Fonseca C.A. 2007. Alimentos transgénicos y alergenicidad. Rev.Fac. Med.; 55: 251-269.
- Boom R.C., Sol J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van, Dillen PM & Van Der NJ. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clinic Microbio 28: 495-503.
- Chakraborty S., Chakraborty N., & Datta A. 2000. Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. National Center for Plant Genome Research, Jawaharlal Nehru University Campus and School of Life Sciences, Jawaharlal Nehru University, New Delhi 110067, India. 3724–3729 u PNAS .vol. 97. Nº.7.
- Doyle J.J. & Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19:11-15.
- Evaluación de la alergenicidad de los alimentos modificados genéticamente. Informe de una Consulta FAO/OMS de Expertos sobre alergenicidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos 22–25 de enero de 2001 Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) Roma, Italia.
- Foster S.J., Park T-H., Pel M., Brigneti G., Sliwka J., Jagger L., Van der Vossen E., Jones J.D. 2009 Rpvnt1.1, a Tm-2 (2) homolog from *Solanum venturii*, confers resistance to potato late blight. MPMI 22, 589–600. Gendel SM. 2002. Sequence analysis for assessing potential allergenicity. Ann NY Acad Sci. 964: 87-98.
- Gutián F. & Carballas T.1976.Técnicas de análisis de suelos.Ed.Pico Sacro. Sanitago de Compostela, 288 pp.
- Jones J.D., Witek K., Verweij W., Jupe F., Cooke D., Dorling D., Tomlinson L., Smoker M., Perkins S. & Foster S. 2014. Elevating crop disease resistance with cloned genes. Phil. Trans. R. Soc. B 369: 20130087.
- Kleter G.A. & Peijnenburg A.A. 2002. Screening of transgenic proteins expressed in transgenic food crops for the presence of short amino acid sequences identical to potential, IgE – binding linear epitopes of allergens.BMC Struct Biol 12: 2-8
- Lamote M. 1981. Estadística biológica: principios fundamentales. 5º Ed.Barcelona. Toray-Masson.163 pp.
- Losada O.A. & Fonseca C.A. 2007. Alimentos transgénicos y alergenicidad. 251-269.
- Norgia W., Goian M., Ianculov I., Dumbrava D. & Moldovan C. 2008. Determinarea Coninutului de glicocalcoide de glicocalcoizi din tuberculii de cartofi (*Solanum tuberosum*) Biotehnologii, vol. 41 (1), Timisoara.
- Pellequer J.L., Westhof E. & Van Regenmortel M.H.V. 1991 Predicting location of continuous epitopes in proteins from their primary structures. Methods Enzymol, 203:176-201
- Raij B., Van de Andrade J.C., Cantarella H. &Quaggio J.A. (eds). 2001. Análise química para a avaliação da fertilidade de solo tropicais. Instituto Agronomico, Campinas, 284 pp.
- Saxena D., & Stotzky G. 2001. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. Soil biology & Biochemistry. 1225-1230.
- SPAC (Soil and Plant Analysis Souncii). 1992. Handbook of reference methods for soil analysis. USA. 202pp.
- Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fiber in Foods. (1991) AOAC Method 991.43. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN,USA.

Turakainen M., Väänänen T., Kanttila K., Ollilainen V., Hartikainen M. & Seppänen, M. 2004. Effect of Selenate Supplementation on Glycoalkaloid Content of Potato (*Solanum tuberosum* L.). J.Agric. Chem. 52, 7139-7143.

Urquiza M. 1996; Experimentos de fisicoquímica. Editorial Limusa. Wiley S.A, México.

## **6. VIABILIDAD DEL PROYECTO: PLAN DE TRABAJO (ETAPAS, RECURSOS ASIGNADOS, CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS, CRONOGRAMA...)**

La realización del presente proyecto será llevado a cabo por el grupo de investigación sobre agricultura transgénica de la UDC formado por: 2 investigadores de la UDC contratados a tiempo completo, un becario predoctoral, en colaboración con 1 investigador y personal de campo del centro de investigaciones agrarias de Mabegondo (CIAM).

Será necesaria la contratación de un técnico de laboratorio durante los 3 años del proyecto.

El equipo de investigación cuenta con un laboratorio de 250m<sup>2</sup> provisto e HPLC, centrifugas, microscopios, agitadores, balanzas de precisión, pH-metro, armario de campo, cubetas de electroforesis, juegos de pipeta, sistema de documentación de geles, autoclave y cámara flujo laminar también posee material para la realización de la PCR pero será necesaria la renovación del material disponible actualmente por nuestro equipo de investigación, con la compra de cuatro micro-pipetas, y un termociclador de 96 pocillos.

Además en las instalaciones presentes en el CIAM, contaremos con la disponibilidad de tres invernaderos de 1000 m<sup>2</sup>, así como todo el material agrícola para la realización de las actividades asociadas a este proyecto, como puede ser arados, agazodones, un tractor, fertilizadora, etc.

El presente proyecto no incluye investigación con animales ni el uso de muestras o microorganismos potencialmente peligrosos para el ser humano. Su ámbito de actuación se circunscribe estrictamente al reino vegetal. Durante el desarrollo de este proyecto se cumplirá la normativa española y comunitaria vigente que regula el uso de plantas genéticamente modificadas. Todos los experimentos se realizarán en los laboratorios del Área de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la UDC. Las plantas transgénicas que puedan ser obtenidas se mantendrán in vitro o bien en invernaderos con condiciones controladas para su observación. Aún así, se adoptarán todas las precauciones necesarias para que el material vegetal se mantenga en condiciones confinadas. Tanto el material vegetal sometido a transformación genética como el material transgénico estudiado será destruido posteriormente mediante autoclave.

Para los análisis de micro nutrientes y metales pesados las muestras serán enviados a los servicios de apoyo a la investigación de la UDC.

	PRIMERAÑO												SEGUNDOAÑO												TERCERAÑO											
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
SIEMBRA																																				
RECOLECCIÓN																																				
ESTUDIO DE ALERGENICIDAD																																				
ANÁLISIS SUELOS																																				
CALIDAD NUTRICIONAL																																				
ESTUJOS DE HIBRIDACIÓN																																				
PUBLICACIÓN DE RESULTADOS																																				

<b>7. ESTIMACIÓN PRESUPUESTARIA: DESTINO DE LA AYUDA SOLICITADA</b>				
<b>CONCEPTOS</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>	<b>TOTAL</b>
Personal contratado	21.371,14	21.371,14	21.371,14	64.113,42
Equipamiento científico-técnico	7740	--	--	7740
Material bibliográfico indispensable para la realización del proyecto	1000	700	--	1700
Material fungible	27.350	18.500	4.800	50.650
Ayudas de coste por desplazamiento	3.500	3.500	3.500	10.500
Ayudas para la realización de estadios de investigación (máximo 10% de la cantidad solicitada)	--	2.500	--	2.500
Otros gastos (especificar)	3000	4500	1500	9000
Costos indirectos o gastos generales que reglamentariamente exige la Universidad al grupo solicitante (máximo 20%)	8945,418	6374,222	2386,228	29240,6
<b>TOTAL</b>	<b>45572,418</b>	<b>38245,228</b>	<b>23757,368</b>	<b>175443,6</b>

Personal contratado: Se hace necesaria la contratación de un técnico de laboratorio durante los tres años del proyecto. Se presupuesta de acuerdo a las tablas de contratación laboral vigentes en la UDC.

Equipamiento científico-técnico: Se plantea la compra de un juego de cuatro micro-pipetas especiales para biología molecular (774 €), y un termociclador de 96 pocillos (7000 €).

Material fungible: Es necesaria para la correcta realización del proyecto la compra de mastermix, síntesis de primers, medios de cultivo, solventes orgánicos para la extracción de metabolitos, columnas cromatográficas así como los análisis a pagar en los servicios de apoyo a la investigación...

Ayudas de costo por desplazamiento: Se computan aquí la asistencia a congresos y los desplazamientos para las charlas cooperativas así como estancias formativas del becario predoctoral.

Otros gastos (especificar): gastos de publicación en Open Access y material informático.

## 8. IMPLICACIONES ÉTICAS O DE BIOSEGURIDAD.

La revisión será realizada por el comité de ético de la UDC. El desarrollo y aplicación de la biotecnología junto con la preocupación que estos temas suscitan en el público sobre los posibles efectos adversos para la diversidad biológica, los riesgos para la salud humana y la falta de información, se elaboró el protocolo de Cartagena el 29 de enero del 2000 en Montreal, Canadá.

El objetivo de este protocolo es contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización seguras de los organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana.

En el proyecto que se plantea en este trabajo se utilizará material vegetal y cultivos celulares, bacterianos y fúngicos, por lo que no se plantea ningún problema ético. Se realizarán procesos de esterilización de los materiales de trabajo así como la eliminación de cualquier tipo de material orgánico mediante autoclavado, asegurándonos la imposibilidad de contaminaciones cruzadas que puedan afectar al medio. Además, durante el desarrollo de este proyecto se cumplirán las normativas española y comunitaria vigentes que regulan el uso de plantas genéticamente modificadas.

La normativa actual a nivel europeo, sobre la regulación de transgénicos viene dada por el Reglamento Comunitario 1829/2003, que establece la autorización y comercialización de OMGs y por la Directiva 2008/27 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre la liberación intencionada en el medio ambiente de OMGs.

La legislación en España correspondiente a los OMGs se contempla en la Ley 9/2003, en la que establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de OMGs y el Real Decreto 178/2004 que la desarrolla.

### BIBLIOGRAFIA:

- Anderson L. 2001. Transgénicos. Ingeniería genética, alimentos y nuestro medioambiente. GAIA. Madrid. 224 páginas.
- Mamani M., Salazar A & Yncio K. 2012. Aspectos éticos y políticos de los alimentos transgénicos. Universidad Nacional Cajamarca.

## **9. CONCLUSIONES QUE SE PRETENDEN ALCANZAR**

Con el presente proyecto se pretende demostrar la seguridad del uso de OMGs para su consumo humano y animal, centrándonos en estudiar los principales problemas que se asocian a este tipo de cultivos.

Así se comprobará el efecto de nuestro transgénico en la cubierta edáfica ya que es uno de los principales problemas que se asocian a estos organismos, nos basaremos en el estudio de parámetros básicos como son el pH y la cantidad de elementos disponibles, así como en la realización de recuentos sobre las poblaciones de bacterias y fúngicas presentes en la superficie del suelo que no deben presentar variación ya que no se secreta ningún producto antibiótico al medio.

Se determinará la posible naturaleza alérgica de las proteínas transgénica que puedan estar asociadas a las secuencias contenidas en el gen insertado con el fin de demostrar la seguridad de la utilización de los transgénicos para consumo.

Se realizará también una valoración nutricional del producto transgénico basándose en el análisis de secuencias proteicas, contenido en fibra, valor calorífico así como la determinación de la presencia reducida de glicoalcaloides a consecuencia de la resistencia frente al mildiu que hace aumentar dichos valores.

De acuerdo a la normativa vigente que regula el uso de OMG se demostrará la incapacidad de hibridación de nuestros organismos transgénicos con los individuos salvajes en el medio natural.

## **CONCLUSIONS QUE SE PRETENDEN ACADAR**

Co presente proxecto pretendese demostrar a seguridade do uso de OMGs para o consumo humano e animal, centrándonos en estudalos principais problemas que se asocian a este tipo de cultivos.

Así comprobarase o efecto do noso transxénico na cubierta edáfica xa que é un dos principais problemas que se asocian a estes organismos, basarémonos no estudo de parámetros básicos como é o pH e la cantidade de elementos dispoñibles, así como na realización de recontos sobre as poboacions de bacterias e funxicidas presentes na superficie do solo que no deben presentar variación xa que no se secreta ningún produto antibiótico o medio.

Determinarase a posible natureza alerxénica das proteínas transxénicas que podan estar asociadas as secuencias contidas no xen insertado, co fin de demostrar a seguridade da utilización dos transxénicos para consumo.

Realizarase tamén unha valoración nutricional do produto transxénico basándose no análise de secuencias proteicas, contido en fibra, valor calorífico así como a determinación da presenza reducida de glicoalcaloides a consecuencia da resistencia fronte o mildiu que fai aumentar ditos valores.

Acordo coa normativa vixente que regula o uso de OMG demostrarase a incapacidade de hibridación do noso organismos transxénicos cos individuos salvaxes no medio natural.

## **CONCLUSIONS OR MILESTONES TO BE ACHIEVED**

With the present Project, it is tried to demonstrate the safety use of GMOs for human and animal consumption, focusing on studying the major problems associated with this type of crop.

Thus, the effect of our transgenic in the soil cover is checked since it is one of the main problems associated with these organisms, we will rely on the study of basic parameters such as pH and the amount of available elements, as well as the performance bacteria and fungal populations counts presents on the soil surface that must not show variations since no antibiotic product is secreted to the medium.

It was determinated the possible allergic nature of transgenic proteins that may be associated with the sequences contained in the gene inserted, in order to demonstrate the safety use of transgenic consumption.

It was also performed a nutritional assessment of the transgenic product based on protein sequences analysis, fiber content, calorific value and the determination of the presence of glycoalkaloids as a result of resistance against mildew, which increase these values.

According to the current regulations governing the use of GMOs, inability hybridization of our transgenic organisms with wild individuals in the natural environment will be demonstrated.