

# Del laboratorio a la producción comercial de un OVGGM: un desarrollo de la Biotecnología Argentina

- BIO-ECONOMIA ARGENTINA 2015

25 Y 26 DE Junio de 2015  
Bolsa de Comercio de Rosario  
SANTA FE, ARGENTINA

Valeria Rudoy  
Tecnoplant – Sidus S.A.



# Virosis causada por PVY (Potato Virus Y) Potyviridae



Transmision  
mediante áfidos



Disminución de la  
producción de  
tubérculos



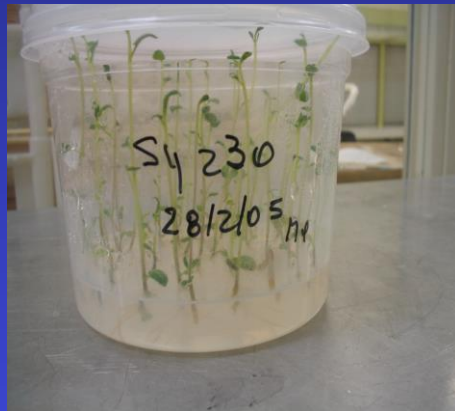
# Construcciones genéticas y transformación vegetal

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (CONICET)

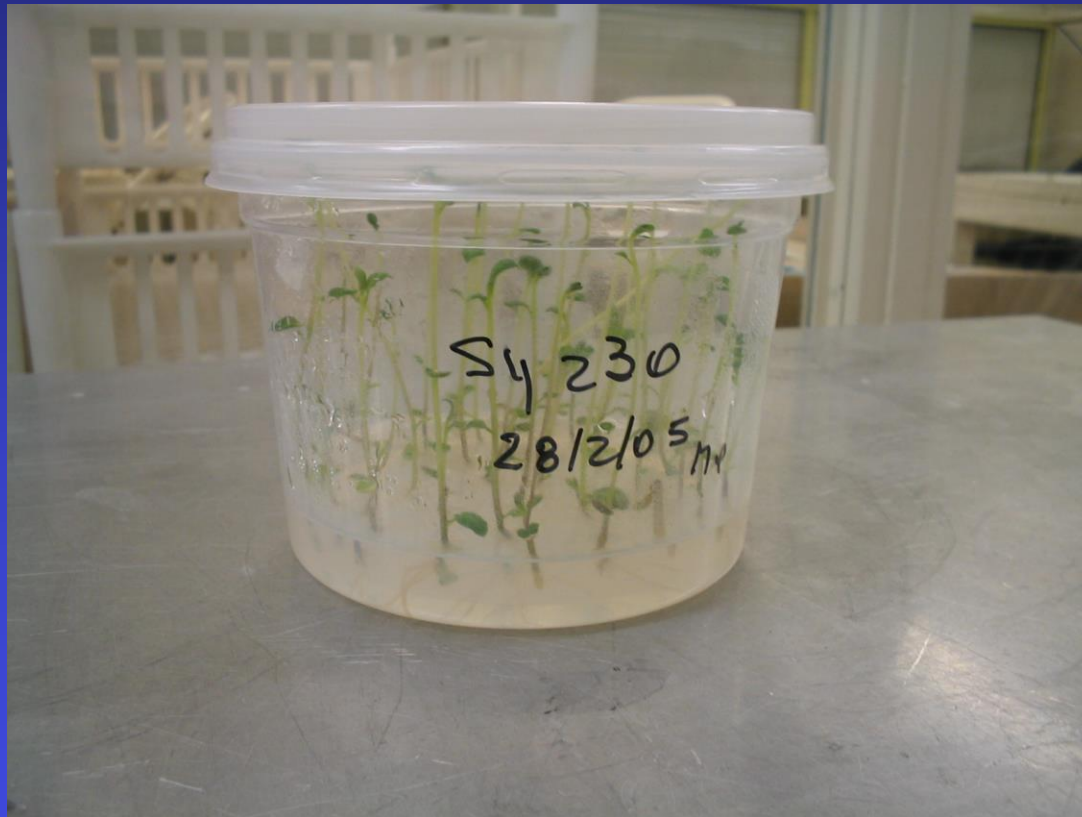


Dr. Fernando Bravo Almonacid y Dr. Alejandro Mentaberry, CONICET

# Clonación del evento resistente a PVY por micropropagación



Plantines de papa modificados con genes de proteína de cápside del virus PVY, que lo hacen resistente al virus





# Rusticación de los eventos in vitro previo a ser plantados en invernáculo



# Jaula construída bajo normativa regulatoria para ensayos de papa PVY





# Jaula construída bajo normativa regulatoria para ensayos de papa PVY



# Ensayo de inoculación de virus PVY

## Evaluación a los 17 días



# Spunta con síntomas. 17 días de ensayo



# Eventos resistentes al virus PVY seleccionados



# Línea SY233

## Ensayos comparativos



### Infección Natural

SY233	0/1500 infectadas
Spunta	450/1500 infectadas

# Ensayos en invernadero

Localidad de Camet  
SY 233  
Agosto 2004



# Ensayos en invernaculo y a campo Malargüe Septiembre 2005



## Preparación de invernáculo para siembra en Malargue





# Ensayos a campo Localidad Barreal – San Juan Febrero 2006







Evento con flor androestéril



# Ensayos en Malargüe Invernáculo

## Marzo 2006



Evento SY 233 en Invernáculo

# Ensayos en Malargüe Invernáculo

## Marzo 2006



Evento SY 233 en Invernáculo

# Ensayos en Malargüe Invernáculo - Campo Marzo 2006



Crecimiento de plantas a campo bajo túneles



Dificultades causadas por los túneles: dificultad en riego





Malezas cercanas al cultivo. Ausencia de solanáceas



**Ensayos a campo  
Villa Retiro Córdoba  
Marzo 2006**



## Ensayo Comparativo de Rendimiento Córdoba



## Ensayo Comparativo de Rendimiento Córdoba





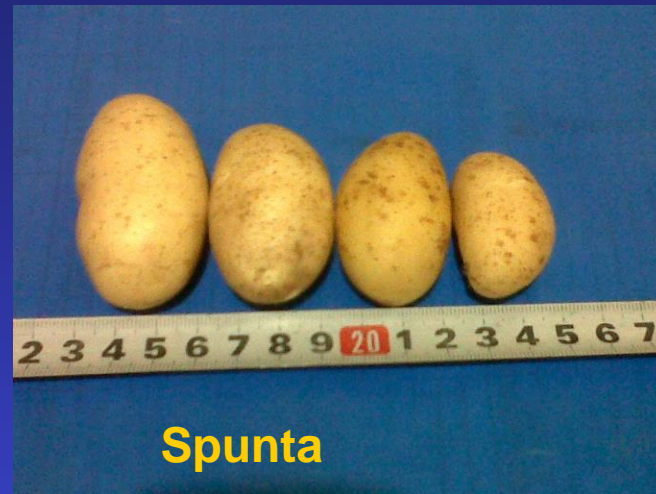
# Ensayo Comparativo de Rendimiento Malargüe







# Comparación fenotípica de los tubérculos GM SY233 vs. Spunta



# Primeros análisis de Papa Spunta resistente a virus PVY en Argentina

## Composición química

EVENTO SY 233      EVENTO SY 230      CONVENCIONAL

<b>RESULTADOS OBTENIDOS</b>			
<b>Determinaciones</b>	<b>Papas Genéticamente Modificadas 1</b>	<b>Papas Genéticamente Modificadas 2</b>	<b>Papas Control (Spunta convencional)</b>
Sólidos Totales(g/100g)	21,0	19,0	17,3
Humedad (g/100g)	79,0	81,0	82,7
Cenizas (g/100g)	0,7	0,7	0,7
Proteína ( N x 6,25) (g/100g)	2,6	2,3	1,9
Proteína soluble (g/100g de proteínas totales)	84,3	87,7	88,2
Materia grasa (g/100g)	0,06	0,06	
Grasa trans (g/100g)	No se detecta	No se detecta	No se detecta
Fibra cruda (g/100g)	0,5	0,5	0,4
Fibra dietaria (g/100g)	1,9	1,3	1,4
Hidratos de carbono (g/100g)		14,6	
Dextrosa			
Sacarosa			

# Productores Paperos en el proyecto:

Semillas Aguado:

- Malargüe zona “papa semila”
- Tupungato zona productora

Ing. Agr. J.Cozzoli:

- San Juan zona “papa semilla”
- SE Buenos Aires zona productora

Dr. Marcelo Huarte- EEA INTA Balcarce

- 
- Temprana  
Tucumán, Salta; Jujuy, Corrientes, Misiones
  - Semitemprana  
Bs Aires, Córdoba, Mendoza, Santa Fe,  
Tucumán
  - Semitardía  
Buenos Aires, Mendoza, Río Negro, Chubut
  - Tardía  
Córdoba, Mendoza, Santa Fe



# ETAPAS DEL PROCESO REGULATORIO



# Productividad

Localidad	Variedad	Producción total (g/plot)	Número de tubérculos / tallo	Peso promedio de los tubérculos (g)
	SY 230	3426 ± 899	5	46
<b>Balcarce</b>	SY 233	4225 ± 376	5,4	59
	Spunta	4265 ± 1497	6,5	45
	SY 230	4025 ± 1281	2,9	33
<b>Córdoba</b>	SY 233	4010 ± 1536	2,6	35
	Spunta	3040 ± 1627	2,6	30
	SY 230	2450 ± 490	2,6	44
<b>Malargüe</b>	SY 233	2100 ± 540	2,7	43
	Spunta	2900 ± 1000	2,6	43
	SY 230	8271 ± 2985	2,7	43
<b>San Juan</b>	SY 233	8780 ± 3088	2,9	44
	Spunta	8275 ± 2323	2,6	43

# Características y análisis químicos de los tubérculos

Localidad	Variedad	Gravedad específica	Almidón	Materia seca (%)	Color de los chips	Glicoalcaloides mg en 100 g de peso fresco		
						Solanina	Chaconina	Total
<b>Balcarce</b>	SY230	1,066	11,0	18,0	4,5	2,40 ±	6,47 ±	8,87
	SY233	1,068	11,3	18,6	7,5	3,18 ± <sup>0,18</sup>	8,94 ± <sup>0,37</sup>	12,12
	Spunta	1,069	11,6	18,8	6	1,98 ± <sup>0,48</sup>	6,05 ± <sup>1,03</sup>	8,03
<b>Córdoba</b>	SY230	1,083	14,6	20,7	8	3,10 ± <sup>0,27</sup>	7,10 ± <sup>0,50</sup>	10,20
	SY233	1,081	14,0	20,5	8	3,26 ± <sup>0,43</sup>	7,63 ± <sup>0,70</sup>	10,89
	Spunta	1,086	15,1	21,5	6,5	3,43 ± <sup>0,67</sup>	9,17 ± <sup>1,37</sup>	12,60
<b>Malargüe</b>	SY230	1,057	9,1	16,5	3,5	1,63 ± <sup>0,09</sup>	4,68 ± <sup>1,34</sup>	6,31
	SY233	1,064	10,6	17,5	3	1,71 ± <sup>0,44</sup>	5,51 ± <sup>1,68</sup>	7,22
	Spunta	1,063	10,3	17,4	3	2,79 ± <sup>0,21</sup>	5,93 ± <sup>0,77</sup>	8,72
<b>San Juan</b>	SY230	1,080	10,7	22,8	6	1,32 ± <sup>1,79</sup>	5,07 ± <sup>2,70</sup>	6,39
	SY233	1,081	11,1	22,2	6	2,73 ± <sup>0,03</sup>	8,27 ± <sup>0,19</sup>	11,00
	Spunta	-	-	-	-	2,60 ± <sup>0,57</sup>	8,44 ± <sup>3,26</sup>	11,04

0,25

3,16

## Características y análisis químicos de los tubérculos

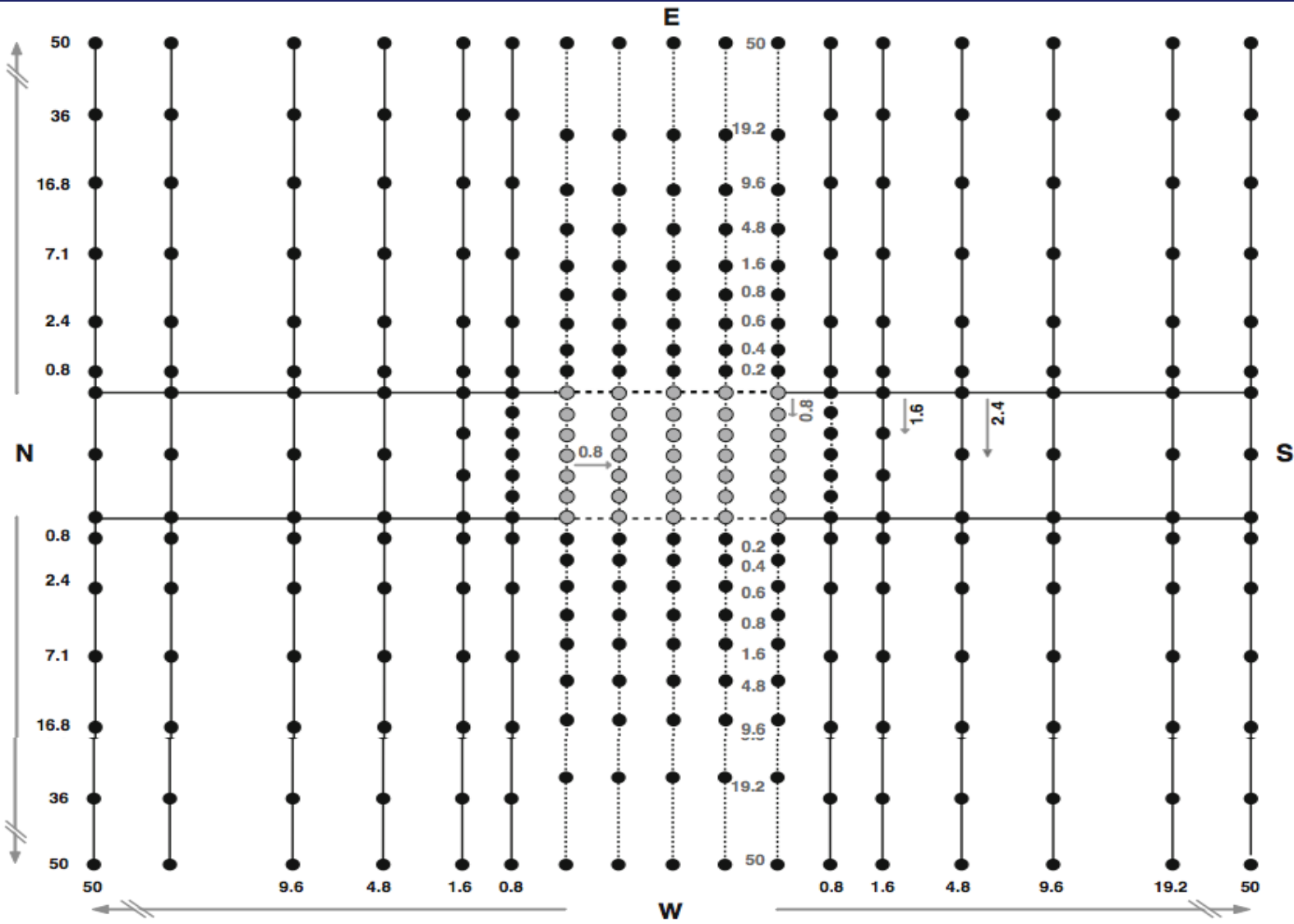
Localidad/ Variedad	Proteína total (g/100g DW)	% Soluble proteins	Fat (g/100g DW)	Crude Fiber (g/100g DW)	Ashes (g/100g DW)	Carbohydrates (g/100g DW)
<b>San Juan</b>						
SY230	2.25 ± 0.17	68.5 ± 6.8	0.45 ± 0.06	0.60 ± 0.00	1.22 ± 0.07	19.6 ± 0.13
SY233	1.85 ± 0.06	70.4 ± 5.1	0.45 ± 0.13	0.55 ± 0.06	1.12 ± 0.08	21.1 ± 1.09
Spunta	2.42 ± 0.61	68.3 ± 7.6	0.48 ± 0.10	0.45 ± 0.06	1.23 ± 0.23	20.8 ± 2.37
<b>Balcarce</b>						
SY230	2.32 ± 0.10	64.3 ± 6.9	0.42 ± 0.10	0.65 ± 0.17	1.09 ± 0.10	16.6 ± 2.23
SY233	2.18 ± 0.05	61.5 ± 11.3	0.35 ± 0.06	0.62 ± 0.10	1.15 ± 0.05	16.8 ± 2.38
Spunta	2.25 ± 0.19	62.1 ± 20.1	0.45 ± 0.06	0.62 ± 0.05	1.11 ± 0.17	16.6 ± 3.75
<b>Malargüe</b>						
SY230	2.25 ± 0.37	65.8 ± 3.9	0.40 ± 0.00	0.58 ± 0.05	1.11 ± 0.08	13.8 ± 1.05
SY233	2.45 ± 0.06	70.0 ± 7.4	0.48 ± 0.05	0.65 ± 0.17	1.05 ± 0.13	17.4 ± 1.18
Spunta	2.50 ± 0.14	78.1 ± 10.0	0.42 ± 0.10	0.48 ± 0.05	1.08 ± 0.03	15.6 ± 0.63



# Ensayo de flujo génico

## *Solanum GM PVY vs. Solanum chacoense*





● *S. chacoense*    ● *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. Spunta SY233

**Fig. 5** Field trial design to assess pollen-mediated gene transfer from *S. tuberosum* (cv Spunta) to *S. chacoense*. Each dot corresponds to an individual plant. Black dots: *S. chacoense*

plants. Grey dots: *S. tuberosum* plants. Distances between rows are indicated in meters





















## Field testing, gene flow assessment and pre-commercial studies on transgenic *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* (cv. Spunta) selected for PVY resistance in Argentina

Fernando Bravo-Almonacid · Valeria Rudoy · Bjorn Welin · María Eugenia Segretin ·  
María Cecilia Bedogni · Fabiana Stolowicz · Marcelo Criscuolo · Marcelo Foti ·  
Maximiliano Gomez · Mariana López · Germán Serino · Silvia Cabral ·  
Cristina Dos Santos · Marcelo Huarte · Alejandro Mentaberry

Received: 2 August 2011 / Accepted: 16 December 2011  
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

**Abstract** *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* (cv. Spunta) was transformed with a chimeric transgene containing the Potato virus Y (PVY) coat protein (CP) sequence. Screening for PVY resistance under greenhouse conditions yielded over 100 independent candidate lines. Successive field testing of selected lines allowed the identification of two genetically stable PVY-resistant lines, SY230 and SY233, which were further evaluated in field trials at different potato-

producing regions in Argentina. In total, more than 2,000 individuals from each line were tested along a 6-year period. While no or negligible PVY infection was observed in the transgenic lines, infection rates of control plants were consistently high and reached levels of up to 70–80%. Parallel field studies were performed in virus-free environments to assess the agronomical performance of the selected lines. Tubers collected from these assays exhibited agronomical traits and biochemical compositions indistinguishable from those of the non-transformed Spunta cultivar. In addition, an interspecific out-crossing trial to determine the magnitude of possible natural gene flow between transgenic line SY233 and its wild relative *Solanum chacoense* was performed. This trial yielded negative results, suggesting an extremely low probability for such an event to occur.

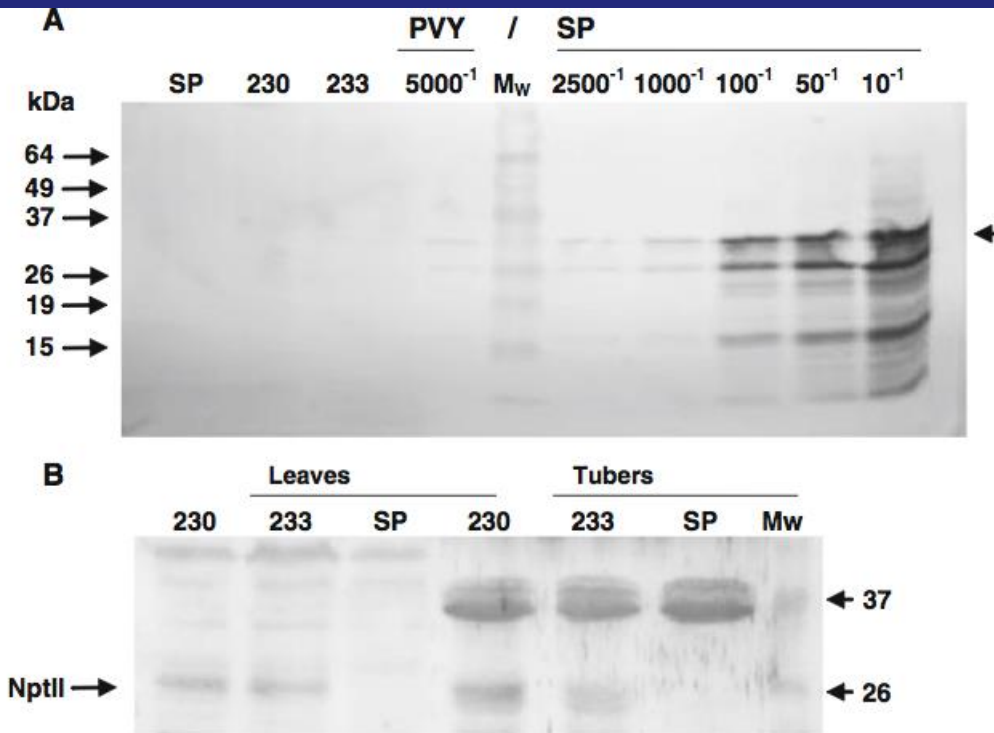
**Keywords** Field evaluation · Potato · Spunta · PVY · Coat protein · Transgenic · Resistance · Gene flow

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11248-011-9584-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

F. Bravo-Almonacid (✉) · M. E. Segretin ·  
S. Cabral · A. Mentaberry  
Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y  
Biología Molecular (CONICET), Vuelta de Obligado  
2490 (C1428ADN), Buenos Aires, Argentina  
e-mail: fbravo@dna.uba.ar

F. Bravo-Almonacid  
Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad  
Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina





**Fig. 4** Western blot analysis of lines SY230 and SY233. **a** Total soluble proteins were isolated from SY230 (230), SY233 (233), non-transformed Spunta (SP) and PVY-infected Spunta (PVY/SP) leaf extracts, separated by PAGE-SDS, transferred to a nitrocellulose membranes and revealed with anti-PVY antibodies. Numbers ( $10^{-1}$ – $5.000^{-1}$ ) indicate the dilutions of

PVY-infected potato leaf extracts loaded in each lane. **b** Total soluble proteins from leaf or tuber extracts revealed with anti-NptII antibodies. *Arrows* indicate the position of molecular weight markers (BenchMark Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen), the PVY CP (CP) or the NptII protein (NptII).

- No hay detección de proteína de cápside del virus PVY.
  - Las características bioquímicas y morfológicas sin diferencias significativas