



INFORME DE EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA LIBERACIÓN EN CAMPO DE PLANTAS DE PATATA MODIFICADO GENETICAMENTE

(Notificación B/ES/19/02)

Antecedentes

Con fecha 16 de enero de 2019, la Autoridad competente de Castilla y León envió la notificación B/ES/19/02, solicitando el informe de evaluación del riesgo de la Comisión Nacional de Bioseguridad en relación con un ensayo de campo con patatas modificadas genéticamente (patata Susy, variedad Atlantic), que expresan mayor contenido de almidón y de proteínas solubles, de la empresa Iden Biotechnology S. L.

Aunque no existen liberaciones anteriores de estas líneas de patata Atlantic modificadas con el gen *Susy* de patata, como parte del trabajo de investigación realizado en colaboración con el Instituto de AgroBiotecnología (Navarra), ya se realizaron dos ensayos de liberación voluntaria utilizando el mismo gen y la misma construcción pero introducidos en otra variedad de patata, variedad Desiree (notificaciones B/ES/06/33 y B/ES/06/34). En este caso, se ha realizado la transformación en Atlantic pues es una variedad comercial que tiene ya un mayor contenido en almidón por lo que se espera que esta mejora sea relevante en su aplicación a futuros proyectos de producción de biocombustibles.

Objetivo y características del OMG

El objetivo del ensayo consiste en la propagación y evaluación en campo de la productividad de 10 líneas de patata modificadas genéticamente, variedad Atlantic, (aunque inicialmente se solicitó la evaluación de 20 líneas, finalmente se ha reducido a 10) que sobreexpresan el gen endógeno *Susy* de *Solanum tuberosum*.

El trabajo que presenta IDEN se enmarca dentro del desarrollo de un proyecto de investigación sobre el papel de la sacarosa sintasa (*Susy*) en la biosíntesis del almidón. Los datos obtenidos en años de investigación en las rutas de biosíntesis del almidón han permitido demostrar que la sacarosa sintasa está involucrada directamente en la biosíntesis del almidón, tanto en tejidos heterotróficos (Baroja-Fernández *et al.*, 2004) como en tejidos fotosintéticos (Muñoz *et al.*, 2005).

Características y duración del ensayo

La liberación se realizará en el municipio de Barbadillo (Salamanca), polígono 4, parcela 10. El ensayo se localizará en la finca Muñovela que pertenece al IRNASA-CSIC. En 125 metros a la redonda del ensayo el área pertenece al CSIC, garantizando así que no habrá ningún cultivo de patata en esa área. El resto del terreno alrededor son tierras de secano, y solamente a unos 300 m hay una zona con regadío donde nunca se ha cultivado patata pues es una zona donde se realizan ensayos con cereales, forraje y algo de oleaginosa.



El área total del ensayo será de 589,60 m², de ellos, 297m² corresponderán al área interna donde se cultivarán las líneas de patatas modificadas y 292,60m² corresponderán al área alrededor donde se colocarán patatas convencionales que rodearán el ensayo como un borde y que captarán el polen que se pueda producir.

Se sembrarán 10 líneas modificadas (5, 6, 7, 8, 36, 38, 39, 44, 50 y 61), incluyendo además como controles una línea *null* (muestra de una línea obtenida durante el proceso de regeneración *in vitro* pero que no contiene el gen) y controles *wt* (no transgénicos). Cada línea tendrá tres repeticiones conteniendo 2 surcos en cada repetición (12 bloques). En cada uno de ellos se cultivarán un máximo de 90 plantas (divididas en tres sub-parcelas de 30 plantas cada una, dos surcos de 15 plantas/subparcela con unas dimensiones de 1,4 x 3 m, y un diseño experimental de bloques al azar con el fin de poder hacer una valoración estadística de los resultados. Al inicio y al final se incluirán dos surcos de *wt*. Los pasillos entre repeticiones serán de 1,5 m y se dejará después 1,5 m para pasar el rotavátor. En el perímetro que rodea el ensayo se sembrarán 3,5 m con tubérculos de patata convencional. Se establecerá un vallado en todo el perímetro del área sembrada formado por piquetes de 40 x 40 mm clavados a 4 m de distancia y unidos por una malla metálica de 100 x 8 x 15 mm.

Con este diseño, en el área experimental se usarán 1.080 plantas totales y 2.146 plantas en la zona borde. Se ha aportado el diseño del ensayo.

En cuanto al periodo de liberación se propone realizar dos liberaciones en dos años consecutivos: 2019 y 2020. La primera liberación se realizará entre mayo-octubre de 2019, con el fin de obtener resultados preliminares. La segunda se pretende realizar entre mayo-octubre de 2020 con un menor número de líneas pues se escogerán aquellas que presenten mayor contenido de almidón en los tubérculos y mejores rendimientos respecto a las plantas controles no modificadas (*wt*).

Identificación y Caracterización de Riesgos Potenciales

a) Caracterización molecular

Para la transformación genética de esta patata se empleó el método de infección de hojas de plántulas de patata mantenidas *in vitro* mediante infección con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58C1-GV2260 (Rocha-Sosa *et al.*, 1989).

El vector utilizado es el plásmido binario pBIN20 (Hennegan and Danna, 1998). Este plásmido simplifica la clonación y por tanto facilita la obtención de plantas modificadas genéticamente. En la construcción genética se incorporan los siguientes elementos:

- Borde derecho (RB): secuencia del borde Ti-DNA derecho.
- NOS-pro: promotor del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*.
- Gen de selección (Kan): Gen *NPTII* que confiere resistencia a kanamicina.
- Terminador (NOS): señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*.
- enh CaMV: secuencia “Ω RNA leader” que potencia la expresión del promotor.



- Promotor del transgen (35S CaMV pro): promotor del virus del mosaico de la coliflor.
- *Sus4*: gen que codifica para la enzima sacarosa sintasa de patata (*Solanum tuberosum* subespecie *tuberosum*) de 2425 pares de bases (pb).
- Terminador (NOS): señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*.
- Borde izquierdo (LB): secuencia del borde Ti-DNA izquierdo.

El fragmento del plásmido binario que se inserta en el genoma de la planta modificada genéticamente es la región entre el borde izquierdo (LB) y derecho (RB) del Ti DNA y su tamaño es de aproximadamente 6000 pares de bases (pb).

El número de inserciones en el genoma de la célula vegetal y sus tamaños se han determinado mediante Southern blot a partir de DNA genómico de hojas digerido con la enzima de restricción *EcoRI* y en la hibridización se ha usado una sonda específica del gen de selección (*NptII*), que le confiere a la planta resistencia al antibiótico kanamicina.

Se utilizó la técnica de marcaje y revelado con quimioluminiscencia para el análisis Southern blot y en él se aprecian bandas de diferentes tamaños a lo largo del gel indicando inserciones en diversas zonas del genoma. También se observa en todas las muestras (incluyendo los controles negativos *null* y *wt*) una banda por debajo de la primera banda de 23.1 kbp del marcador de peso molecular, de aproximadamente 20 kpb que se debe a una hibridación inespecífica.

Solamente en 10 líneas (L5, L6, L7, L8, L36, L38, L39, L44, L50 y L61) se amplificó una única banda y por tanto presentan una sola inserción o copia del gen *Susy*, por lo que serán las líneas elegidas para estudiar en el ensayo de liberación.

La incorporación del gen *Susy* al genoma vegetal también ha sido comprobada mediante PCR usando oligonucleótidos específicos para amplificar una región entre el promotor 35SCaMV y el gen *Susy* de un tamaño alrededor de 548 pb. Los resultados obtenidos demuestran que todas las líneas presentan amplificación de una banda con el tamaño que corresponde al gen *Susy*.

También se realizaron determinaciones de la expresión del gen *Susy* mediante q-PCR, que permite evaluar los niveles de expresión relativa del mRNA respecto al control que no contiene el transgén. Se pudo observar que la actividad relativa del gen está incrementada en casi todas las líneas modificadas en mayor o menor medida.

Finalmente, también se cuantificó la actividad enzimática de la enzima Sacarosa Sintasa en los tubérculos, evaluando la expresión del gen a nivel de expresión de la proteína, comprobando que los niveles de actividad fueron mayores en casi todas las líneas modificadas. Así mismo, se cuantificó el contenido de almidón en los tubérculos que mostró incrementos en varias de las líneas modificadas.

La Comisión Nacional de Bioseguridad únicamente indica que, en el caso de que se prevea un futuro uso comercial de esta planta transgénica, previamente debe eliminarse cualquier gen de resistencia a antibiótico expresado por la planta.



b) Capacidad de transferencia del material genético:

La patata (*Solanum tuberosum* L) forma parte de la familia de las solanáceas. Es un cultivo herbáceo anual, tetraploide ($4x = 48$) y se reproduce de forma vegetativa mediante tubérculos, tallos subterráneos modificados y engrosados donde se acumulan los nutrientes de reserva para la planta. El número de tubérculos que llegan a la madurez depende de la humedad y los nutrientes disponibles en el suelo, y pueden variar en forma, color y tamaño según la variedad.

El cultivo de la patata se originó en la cordillera andina, en América del Sur y América Central, con el centro de mayor variabilidad situado en los Andes peruanos y bolivianos, donde se han descrito más de 100 especies silvestres e indígenas.

El ciclo completo del cultivo se desarrolla entre 3 y 6 meses dependiendo de la variedad, y en nuestro hábitat no hay especies afines con la que pueda formar híbridos fértiles.

Aunque presenta también reproducción sexual, la floración, fecundación y fructificación es irregular en la gran mayoría de los cultivares comerciales. La planta de patata es autógama, con un porcentaje variable de fecundación cruzada, que depende de las variedades. Se sabe que hay variedades que no florecen y otras que son estériles, sobre todo si están en ambientes muy distintos a los de su origen (como es el caso de la mayoría de las variedades comerciales actuales que se cultivan en Europa).

En ensayos previos realizados con plantas de la variedad Desireé modificadas con este mismo gen, tanto en condiciones controladas (invernadero y fitotrón), como en ensayos realizados en campo (notificaciones B/ES/06/33 y B/ES/06/34), no se observó ninguna modificación que afectase la reproducción. En todos ellos se observó que tanto las líneas *wt*, como las líneas modificadas formaban flores solo en un 80% de las plantas, y que de estas flores nunca se obtuvieron frutos (en el caso de los ensayos de campo porque se eliminaron manualmente y en el caso de ensayos en invernadero porque se caían espontáneamente antes de fructificar).

c) Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación:

Al término de la temporada de crecimiento, las hojas y tallos de la planta se marchitan a nivel del suelo y los nuevos tubérculos se desprenden de sus estolones. Los tubérculos son estructuras subterráneas de supervivencia pues sirven como almacén de nutrientes que les permiten a la planta sobrevivir al frío para más tarde ser capaces de brotar y reproducirse.

La supervivencia de la planta parece no verse afectada pues el gen *Susy* incorporado es un gen propio de la planta. En ensayos realizados tanto en condiciones controladas (invernadero y fitotrón), así como en los ensayos realizados en campo con plantas modificadas de la variedad Desireé con este mismo gen (notificaciones B/ES/06/33 y B/ES/06/34), no se apreció ninguna modificación que afectase la supervivencia de forma positiva o negativa, solamente se afectan los niveles de almidón acumulado en los tubérculos (Baroja-Fernández *et al.*, 2009).



La diseminación de esta especie se realiza por tubérculos, no mediante polen o semillas, por lo que es un proceso muy controlado y por ello solo se esperara encontrar plantas en la propia zona del ensayo. Además, fuera de las áreas cultivadas es poco probable que la patata se establezca pues no son competitivas (Love, 1994) y es muy raro que escape hacia hábitats salvajes.

Solanum tuberosum es polinizada por insectos Himenópteros, particularmente aborros (Eastham and Sweet 2002; Hawkes 1988; Scurrah *et al.*, 2008). Sin embargo, estos insectos visitan solamente los extremos de las parcelas pues, por lo general, permanecen cerca de sus colonias (Batra, 1993; McPartlan y Dale, 1994) y vuelan poco más allá de los 500 metros. Las abejas domésticas (*Apis mellifera L.*) no visitan las flores de patata (Sanford and Hanneman, 1981) posiblemente por el tipo de polinización que requieren.

El rol del viento en la polinización de patata es menor (White 1983), esto se debe a que los cruces decrecen rápidamente hasta los 4.5 m (Conner, 1993; Dale *et al.*, 1992; McPartlan y Dale, 1994; Tynan *et al.*, 1990). Por ejemplo, en la variedad Désirée se demostró usando el marcador *nptII* (McPartlan y Dale, 1994) que solamente el 2% de las plántulas contenían el marcador de selección hasta distancias de 3 m, el 0.017% hasta distancias de 10 m y ninguno fue observado después de 20 m. En estudios similares realizados en la variedad CRD Iwa usando el gen marcador de la acetolactato sintasa, (Tynan *et al.*, 1990) observaron que dentro del ensayo solamente el 1.14% de las plántulas eran resistentes en distancias entre 1,5-3 m, este valor disminuía a 0,05% entre 3-4,5 m y después de los 4,5 m no se observaron plántulas resistentes. En cruces realizados entre la variedad Désirée y el híbrido estéril masculino British Queen, se encontraron evidencias de cruces hasta los 23 m (Petti *et al.*, 2007). Sin embargo, solamente se produjeron cuatro frutos con semillas y solamente 23 de las plantas germinadas fueron identificadas como híbridos.

Estos estudios muestran que en caso de que las flores produzcan polen viable, es muy poco probable que se produzcan híbridos con plantas de patata más allá de los 30 m.

Cualquier cambio observado durante o tras finalizar este ensayo en relación con estas características deberá comunicarse a la CNB.

d) Estabilidad genética y fenotípica:

Al haberse utilizado el promotor 35SCaMV, que es un promotor constitutivo, todos los tejidos de la planta transgénica expresan el gen *Susy*. Las líneas modificadas genéticamente son estables pues la multiplicación de las mismas se ha realizado previamente mediante propagación clonal a partir de material *in vitro* y posteriormente, mediante los tubérculos, y lo seguirán realizando de esta forma. Además, periódicamente a las plantas se les realiza una PCR para comprobar que el gen se encuentra insertado.

La Comisión Nacional de Bioseguridad considera que deberían aprovecharse estos estudios para avanzar en los estudios de estabilidad.



e) Efectos alérgicos o tóxicos

Como se ha usado un gen endógeno de la propia patata no deberían presentarse efectos tóxicos, nocivos o alérgicos pues la patata que se ha consumido desde que se cultiva en Europa contiene este gen y se ingiere de forma habitual en la dieta humana sin causar ningún tipo de problema.

Además, se indica que las patatas modificadas incluidas en este proyecto son para investigar si la sobreexpresión del gen *Susy* en la variedad Atlantic incrementa el contenido de almidón en los tubérculos y su futuro aprovechamiento será la extracción de almidón con fines industriales y concretamente, la producción de energías alternativas (bioetanol).

No obstante, ante la preocupación de un posible desvío a alimentación humana se propone realizar más adelante, si fuera necesario, los oportunos análisis toxicológicos y alérgicos.

f) Efectos sobre organismos no diana

Dado que las características fotosintéticas y las necesidades nutricionales de la planta modificada no difieren de las plantas control, no habrá efectos sobre el entorno abiótico. Los estudios previos realizados hasta la fecha (patata variedad Desireé transformada con el mismo gen (*Susy*) en invernadero (Muñoz *et al.*, 2005) y campo (Baroja-Fernández *et al.*, 2009), no indicaron ninguna relación directa entre la acción del gen en la planta (incremento de los niveles de almidón) con interacciones con ningún organismo.

No obstante, la CNB considera adecuado que se realice una observación detallada durante el ensayo para comprobar si se produce algún efecto adverso sobre alguna especie no diana, en las condiciones del ensayo propuesto.

g) Interacciones con el entorno abiótico

No se esperan interacciones con el entorno abiótico pues las necesidades nutricionales de las plantas modificadas no han diferido de las necesidades de las plantas control (*wt*). Los ensayos de liberación realizados en plantas de patata con el mismo gen (*Susy*) pero introducido en la variedad Desireé (solicitudes B/ES/06/33 y B/ES/06/34) no mostraron ningún tipo de efecto.

h) Posible impacto en el medio ambiente debido a las técnicas de cultivo, gestión y cosecha

Se indica que las técnicas que se utilizarán no son diferentes a las del cultivo de la patata convencional por lo que no esperan impactos distintos.

Medidas de gestión: control del ensayo y tratamiento de residuos

La Comisión Nacional de Bioseguridad considera adecuadas, en general, las medidas propuestas por la empresa Iden Biotechnology S. L. para llevar a cabo el control de la parcela del IRNASA-CSIC y la



zona de bioseguridad, antes, durante y después del ensayo, que se detallan a continuación. No obstante, se indican (en negrita) algunas medidas adicionales que deberán ser tenidas en cuenta:

- El material vegetal desde el invernadero confinado de tipo 1 localizado en Iden Biotechnology S.L hasta la finca donde se realizará la liberación voluntaria, presentará un seguimiento exhaustivo. Los tubérculos se trasladarán dentro de sobres debidamente rotulados que se colocarán dentro de cajas de plástico selladas y debidamente rotuladas para su transporte.
- El lugar del ensayo se encuentra confinado en una finca vallada y con acceso restringido únicamente para personas autorizadas. **Además, deberá asegurarse que se impida el posible ingreso de animales silvestres o de granja a la finca del IRNASA-CSIC.**
- Se llevará a cabo un control de toda persona que tenga acceso a la parcela del ensayo mediante un registro de entrada, y que no se tomen muestras sin autorización.
- Aunque se indica que no existirán variedades cultivables a menos de 129 metros alrededor del ensayo, de todos modos se eliminarán los botones florares cuando aparezcan y no se sembrará patata dentro de la Finca Experimental.
- Las plantas modificadas se rodearán de cultivos de patata no modificada para que actúen como colector de polen en caso de que las líneas produzcan polen.
- Al inicio, durante el primer mes de la siembra o plantación, se hará un seguimiento semanal del cultivo para controlar su desarrollo. Posteriormente, se realizarán visitas cada dos semanas por parte de personal de Iden Biotechnology S.L, independientemente de que el personal del IRNASA se encargue del chequeo diario del ensayo.
- Se medirá la tasa fotosintética del cultivo en dos momentos: al mes y a los dos meses de la brotación. Además, también se tomarán muestras de hojas al mes y dos meses de la brotación para realizar análisis bioquímicos. Finalmente, en el laboratorio de la EEAD-CSIC se trabajará bajo las normas de laboratorio establecidas por el CSIC, evitando el contacto con material vegetal presente en el laboratorio.
- La cosecha se realizará de forma manual para evitar la posible dispersión de los tubérculos.
- Como medida preventiva, durante el año siguiente al cultivo, no se plantarán patatas en dicha parcela y se hará un seguimiento de los posibles tubérculos que no se hayan recogido para arrancar manualmente las plantas en el momento de inicio de la brotación.
- Para el total de las 10 líneas que se usarán en el ensayo se estima que podrían obtenerse como máximo unos 900 kg. Los tubérculos cosechados manualmente serán trasladados desde Salamanca a Iden Biotechnology S.L. colocados en bolsas de papel debidamente rotuladas y colocadas dentro de cajas de plástico selladas y debidamente rotuladas, y el traslado se realizará en una furgoneta cerrada por personal de Iden Biotechnology S.L.
- Los tubérculos que finalmente no se utilicen en ensayos posteriores de mediciones de almidón, etc., serán destruidos en autoclave en las instalaciones de Iden Biotechnology S.L.
- Después de la cosecha de los tubérculos se labrará el área del ensayo con grada de discos para triturar todo el material vegetal foliar, tanto las plantas modificadas como las plantas usadas como borde y dicho material será enterrado dentro de la finca. Y finalmente, se aplicará un tratamiento con el herbicida glifosato. **Cualquier maquinaria utilizada será limpiada convenientemente.**
- Durante el año siguiente a la realización del ensayo, los técnicos que trabajan en la Finca Experimental se encargarán de revisar semanalmente la parcela para comprobar si hay rebrotes. En tal caso, se arrancará manualmente tanto el brote como el tubérculo del que proceda e



informarán a Iden Biotechnology S.L para que proceda a su recogida y traslado a las instalaciones de Iden Biotechnology S.L para su destrucción por autoclavado. Además, se aplicará un tratamiento con herbicida a la parcela al finalizar el ensayo. **Cualquier anomalía que surja será comunicada al investigador responsable.**

- Por último, para la campaña del año siguiente, 2020, no se usará la misma parcela. Ese ensayo se realizará en otra parcela adyacente a la de este año, 2019.

Consideraciones finales y conclusión

La CNB recomienda que, tal y como se establece en la Ley 9/2003, de 25 de abril, el ensayo sea controlado por los inspectores de la Autoridad competente de la Junta de Castilla y León durante la siembra, la cosecha y destrucción del mismo, y también durante el seguimiento de un año de la parcela tras la finalización del ensayo, con el fin de garantizar el cumplimiento de todas estas medidas de control y gestión.

Por otro lado, se recuerda que para el ensayo propuesto para el año 2020, se deberá presentar previamente el **informe parcial de resultados correspondiente al ensayo del año 2019** (conforme al modelo que figura en el Anexo XI del Reglamento 178/2004, de 30 de enero, de desarrollo de la Ley 9/2003), y que para el ensayo sucesivo se remitirá a la Autoridad competente únicamente los resúmenes de la notificación (SNIFs) en español e inglés, junto con la nueva información que se considere relevante para ese segundo ensayo. Dicho ensayo también será revisado por la CNB, con las condiciones propuestas, y se esperará a la respuesta de la autoridad competente antes de su realización.

Por último, se informa que ante cualquier incidencia se informará a la Autoridad Competente y a la Comisión Nacional de Bioseguridad y se tomarán las medidas adecuadas, incluida la destrucción del ensayo si fuera necesario.

CONCLUSIÓN: Se considera que en el estado actual de conocimientos y con las condiciones de uso propuestas, el ensayo propuesto no supone un riesgo significativo para la salud humana o animal y el medio ambiente.

Una vez concluidos dichos ensayos (2019 y 2020) **se remitirá un informe final de resultados** de los mismos, en español y en inglés, a la Autoridad competente y a la Comisión Nacional de Bioseguridad conforme al modelo que figura en el Anexo XI del Reglamento 178/2004, de 30 de enero, de desarrollo de la Ley 9/2003.

La remisión de esta información será condición indispensable para la concesión de futuras autorizaciones de ensayos con organismos modificados genéticamente.

Madrid, a 20 de marzo de 2019



Bibliografía:

- Baroja-Fernández E., Muñoz F.J., Zanduetta-Criado A., Morán-Zorzano M.T., Viale A.M., Alonso-Casajús N., Pozueta-Romero J. (2004) Most of ADPglucose linked to starch biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:13080-13085
- Baroja-Fernández E., Muñoz F.J., Montero M., Etxeberria E., Sesma M.T., Ovecka M., Bahaji A., Ezquer I., Li J., Prat S and Pozueta-Romero J. (2009) Enhancing sucrose synthase activity in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose, UDPglucose and total yield. *Plant Cell Physiol.* 50: 1651-1662.
- Batra, S. W. T. (1993). Male-fertile potato flowers are selectively buzz-pollinated only by *Bombus terricola* Kirby in upstate New York. *Journal of the Kansas Entomological Society* 66(2):252-254.
- Conner, A. J. (1993). Monitoring "escapes" from field trials of transgenic potatoes: A basis for assessing environmental risks. Pages 33-39. Report on the "Seminar on scientific approaches for the assessment of research trials with genetically modified plants". Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- Dale, P. J., McPartlan, H. C., Parkinson, R., MacKay, G. R. and Scheffler, J. A. (1992). Gene dispersal from transgenic crops by pollen. Pages 73-77 in R. Caspar, J. Landsmann, eds. Proceedings of the 2nd international symposium on the biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms May 11-14, 1992, Goslar, Germany. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig, Germany.
- Eastham, K. and Sweet, J. (2002). Genetically modified organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer. European Environment Agency, Copenhagen.
- Hawkes, J. G. 1988. The evolution of cultivated potatoes and their tuber-bearing wild relatives. *Die Kulturpflanze* 36(1):189-208.
- Hennegan K., Danna K.J. (1998) pBIN20: An improved binary vector for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 129-131
- Love, S. 1994. Ecological risk of growing transgenic potatoes in the United States and Canada. *American Potato Journal* 71(10):647-658.
- McPartlan, H. C. and Dale, P. J. 1994. An assessment of gene transfer by pollen from field-grown transgenic potatoes to non-transgenic potatoes and related species. *Transgenic Research* 3(4):216-225.
- Muñoz F.J., Baroja-Fernández E., Morán-Zorzano M.T., Viale A.M., Etxeberria E., Alonso-Casajús N., Pozueta-Romero J. (2005). Sucrose synthase controls both intracellular ADPglucose levels and transitory starch in source leaves. *Plant Cell Physiol.* 46:1366-1376.
- Petti, C., Meade, C., Downes, M. and Mullins, E. (2007). Facilitating co-existence by tracking gene dispersal in conventional potato systems with microsatellite markers. *Environmental biosafety research* 6(4):223-236.
- Rocha-Sosa M., Sonnwald U., Frommer W.B., Stratmann M., Schell J., Willmitzer L. (1989). *EMBO J.* 23-29.
- Sanford, J. C. and Hanneman, R. E. (1981). The use of bees for the purpose of inter-mating in potato. *American Potato Journal* 58(9):481-485.
- Scurrah, M., Celis-Gamboa, C., Chumbiauca, S., Salas, A. and Visser, R. G. F. (2008). Hybridization between wild and cultivated potato species in the Peruvian Andes and biosafety implications for deployment of GM potatoes. *Euphytica* 164(3):881-892.
- Tynan, J. L., Williams, M. K. and Conner, A. J. (1990). Low frequency of pollen dispersal from a field trial of transgenic potatoes. *Journal of Genetics & Breeding* 44(4):303-305.
- White, J. W. (1983). Pollination of potatoes under natural conditions. *CIP Circular* 11(2):1-2.