

PLIEGO DE PRESCRIPCIONES TÉCNICAS PARA LA CONTRATACIÓN DEL SERVICIO DE “BÚSQUEDA DE MARCADORES MOLECULARES DE RESPUESTA Y RESISTENCIA/TOLERANCIA A *Phytophthora cinnamomi* EN *Quercus ilex* Y *Q. suber*” A ADJUDICAR POR PROCEDIMIENTO ABIERTO.

REF.: TSA0068235.

1. OBJETO Y ALCANCE DEL PLIEGO

El presente Pliego tiene por objeto definir las prescripciones y especificaciones técnicas y normas que regirán la asistencia técnica para los servicios de **SERVICIO DE “BÚSQUEDA DE MARCADORES MOLECULARES DE RESPUESTA Y RESISTENCIA/TOLERANCIA A *Phytophthora cinnamomi* EN *Quercus ilex* Y *Q. suber*”.**

Este pliego junto con el Pliego de Prescripciones Administrativas rigen la adjudicación del contrato, su contenido y efectos, de acuerdo con lo establecido, asimismo, en la Ley 9/2017 de 9 de noviembre por la que se transponen al ordenamiento jurídico español las Directivas del Parlamento Europeo y del Consejo 2014/23/UE y 2014/24/UE, de 26 de febrero de 2014 (En adelante LCSP).

Dichas condiciones serán de aplicación a la totalidad de la prestación y serán supervisadas y evaluadas por personal técnico de Tragsa. La presentación de la proposición por el licitador supondrá la aceptación incondicionada de todas las cláusulas del presente pliego y del Pliego de Prescripciones Administrativas, sin salvedad o reserva alguna

2. ANTECEDENTES

El progresivo deterioro y muerte de árboles en las dehesas y la falta de regeneración a causa del síndrome de La Seca, determinó una respuesta del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación a través de la Subdirección General de Política Forestal, junto con la S.G. de Sanidad e Higiene Forestal mediante la creación de un Grupo de Trabajo en 2017, donde están representando el Ministerio mismo como coordinador, las CCAA más afectadas, y los organismos de investigación y universidades que llevan estudiando este síndrome desde hace tiempo.

El objetivo del grupo es profundizar en el conocimiento y promover actuaciones concretas y prácticas para poner freno al problema. Para ellos se crearon tres subgrupos:

1. Inventario y seguimiento de focos de seca;
2. Mejora genética y fisiológica;
3. Gestión.

El Subgrupo 2 se constituye en base a la importancia que tiene en el síndrome de La Seca, la podredumbre radical asociada a oomicetos del género *Phytophthora*, y tiene como cometido la puesta en común de las

diferentes líneas y enfoques de mejora genética en base a los resultados de trabajos de investigación previos en el ámbito de la selección de materiales vegetales de encina y alcornoque con mayor tolerancia a *Phytophthora*, apoyándose también en trabajos de fitopatología, multiómica, y multiplicación vegetativa de los materiales.

Forman parte de este Subgrupo de trabajo, además del Ministerio:

- la Junta de Andalucía;
- la Junta de Extremadura;
- la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha;
- la propia empresa TRAGSA a través del Vivero de Maceda y de la Subdirección de Innovación;
- la Universidad de Córdoba a través del Equipo de Evaluación y Restauración de Sistemas Agrícolas y Forestales (ERSAF) y del Equipo de Bioquímica, Proteómica y Biología de Sistemas Vegetal y Agroforestal;
- la Universidad de Extremadura a través del Instituto de Investigación de la Dehesa (INDEHESA);
- la Universidad de Huelva a través del Grupo de Investigación, Análisis y Planificación del medio Natural;
- la Universidad Politécnica de Madrid-Universidad Complutense de Madrid;
- la Universidad de Valencia, a través del Grupo de Biotecnología Aplicada a Especies con Interés Forestal (BIOFORA);
- el Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA) a través del Departamento de Investigación Agroambiental;
- el Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG_CSIC) a través del Grupo de Biotecnología y Mejora Forestal;
- y el Centro de Investigación Forestal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CIFOR-INIA) a través del Grupo de investigación genética y Ecofisiología Forestal.

En reuniones mantenidas con el Subgrupo y tras analizar todas las investigaciones y resultados disponibles, el MAPA ha decidido iniciar un Programa Nacional de Mejora de los recursos genéticos de alcornoque y encina con el objetivo final de obtener materiales de estas especies tolerantes a la podredumbre radical provocada por el patógeno *P. cinnamomi* para la restauración de zonas afectadas por el síndrome de La Seca en un futuro próximo.

El MAPA ha encargado a la empresa TRAGSA la ejecución de este programa, estableciendo en el Pliego de Prescripciones Técnicas del Programa Nacional de Mejora y Conservación de los Recursos Genéticos de Encina y Alcornoque frente al Síndrome de La Seca (en adelante, el **Pliego Programa Nacional**) que sea TRAGSA quien realice el grueso de las tareas, pero en coordinación con los Organismos Públicos de Investigación (OPIs) autonómicos miembros del Subgrupo 2 para los trabajos de campo, y con las Universidades y Centros de Investigación de este Subgrupo para los trabajos de mejora genética y fisiológica.

Puesto que el Vivero de Maceda es la unidad de TRAGSA que lleva décadas trabajando en la selección y mejora de alcornoque, y cuenta con un equipo investigador multidisciplinar que conoce y ha trabajado en diferentes proyectos de I + D + i con los OPIs y Universidades miembros del Subgrupo de Trabajo, será el equipo técnico del Vivero el que se ocupe de la coordinación del encargo del MAPA para la realización del Programa.

En este contexto, una de las tareas que se contempla es **búsqueda de marcadores moleculares de respuesta y de resistencia/tolerancia a *Phytophthora cinnamomi* en encina y alcornoque, tanto de tipo SSR como a partir de aproximaciones –ómicas**, lo que permitirá determinar los mecanismos implicados en la respuesta de resistencia/tolerancia a *P. cinnamomi*, así como establecer marcadores moleculares asociados a fenotipos resistentes.

3. DESCRIPCIÓN Y CONDICIONES DE PRESTACIÓN DEL SERVICIO

El objeto del servicio es desarrollar marcadores de tolerancia que permitan identificar individuos tolerantes al estrés producido por *Phytophthora* o por *Phytophthora* y sequía, tanto tipo SSR a partir de los desarrollados en especies de la misma familia botánica, así como marcadores mediante aproximaciones –ómicas, tanto a partir de bellotas como de hojas de brinzales, de árboles con diferente respuesta al oomiceto.

Se utilizarán hojas (análisis por microsatélites de adultos, y análisis multiómico de brinzales) y bellotas (análisis proteómico) muestreadas en individuos localizados en zonas de seca y en las que se haya confirmado la presencia del patógeno, incluyendo árboles escape (sanos, sin síntomas), así como aquellos próximos con síntomas característicos de daños por seca (susceptibles).

Lote 1. Validación de marcadores de tolerancia de tipo SSR (microsatélites) desarrollados en roble y castaño, en hojas de encinas y alcornoques.

Se pretende aprovechar las herramientas y conocimientos actuales en bioquímica y genética para trasladarlos a la mejora genética de encías y alcornoques. Actualmente, hay marcadores tipo EST-SSR desarrollados para castaño, que permiten discriminar árboles resistentes de árboles susceptibles. Para cada especie (2 especies) se analizarán hojas de madres y brinzales (2 tipos de material) con las respuestas más extremas (2 respuestas) a la inoculación con *Phytophthora cinnamomi* y estrés hídrico (2 estreses). De cada combinación de tratamientos se analizarán 20 réplicas. El número total de muestras será por tanto de 320.

Se extraerá el ADN de las muestras de hojas, y se correrán los 18 primers EST-SSR marcadores funcionales verificados en *Quercus robur* y *Castanea sativa* relacionados con tolerancia al estrés hídrico y/o a *P. cinnamomi*, buscando validar estos marcadores para alcornoques y encinas. Los trabajos se realizarán a lo largo de las

anualidades 2020, 2021 y 2022 empleando las muestras suministradas por TRAGSA a partir de las plantas evaluadas en el vivero de Maceda durante ese período.

Lote 2. . Validación de marcadores de variabilidad de tipo SSR (microsatélites) desarrollados en encina, para tolerancia de encinas y alcornoques

Actualmente se dispone de 20 marcadores moleculares microsatélites (10 marcadores nucleares y 10 cloroplásticos) previamente descritos en *Quercus* que han sido usado para llevar a cabo estudios de variabilidad poblacional y diversidad genética en Andalucía. Se pretende determinar si estos marcadores permiten discriminar los genotipos de encinas y alcornoques que presenten un mayor nivel de tolerancia.

Para ello de los árboles seleccionados en focos de seca se recogerán hojas de individuos escape así como individuos con síntomas para un estudio comparativo. El material será recogido de 31 árboles (16 encinas y 15 alcornoques) escape de progenies contrastadas y otros tantos con síntomas.

EL ADN extraído de hojas jóvenes de encina y alcornoque se congelará en nitrógeno líquido tras el muestreo, y será utilizado para la amplificación por PCR de 20 marcadores microsatélite. Los productos de amplificación se analizarán mediante electroforesis capilar. Se usarán tres réplicas biológicas por pareja de cebadores.

Los trabajos se realizarán a lo largo de las anualidades 2020, 2021 y 2022 empleando las muestras suministradas por TRAGSA a partir de los árboles adultos que se vayan identificando como tolerantes o sensibles a través del comportamiento de sus progenies en los ensayos de evaluación del vivero de Maceda durante ese período.

Lote 3. Análisis proteómico en bellota.

A partir del análisis proteómico de las bellotas de los mismos árboles del apartado anterior, se pretende desarrollar marcadores de tolerancia de tipo proteómico. El diseño experimental incluirá las dos especies, individuos escape y sintomáticos, y tres réplicas biológicas por individuo. Para la extracción de proteínas se utilizarán protocolos optimizados para encina. Las proteínas extraídas serán analizadas por electroforesis SDS-PAGE. El perfil proteico se establecerá mediante análisis de imagen (Quantity one). Las bandas para las que se establezcan diferencias estadísticamente significativas entre muestras (individuos escape y con síntomas) se escindirán del gel, se someterán a hidrólisis con tripsina y los péptidos resultantes se analizarán por espectrometría de masas (MALDI/TOF/TOF). La identificación de especies proteicas se llevará a cabo a partir de los datos de masas mediante búsqueda en bases de datos, utilizando el algoritmo MASCOT y SEQUEST. Se utilizarán bases de datos públicas (UniProt, Swiss-prot, NCBI), y específicas para *Quercus* sp. y *Q. ilex* construidas a partir de bases de datos de transcritos. Los trabajos se realizarán a lo largo de las anualidades 2020, 2021 y 2022 empleando las muestras suministradas por TRAGSA a partir de los árboles adultos que se vayan identificando como tolerantes o sensibles a través del comportamiento de sus progenies en los ensayos de evaluación del vivero de Maceda durante ese período.

Lote 4. Análisis multiómico de muestras del ensayo de inoculación de plantones con *P. cinnamomi* de *Q. ilex* y *Q. suber*.

El objetivo de este servicio será la búsqueda de genes y productos génicos marcadores de respuesta y resistencia mediante la profundización en la descripción del transcriptoma, proteoma y metaboloma en presencia de *P. cinnamomi* permitiendo identificar transcritos, proteínas y metabolitos, respectivamente, implicados en la respuesta a la resistencia/tolerancia a *P. cinnamomi*.

El material vegetal usado en este experimento provendrá del ensayo en invernadero bajo condiciones controladas llevado a cabo por TRAGSA en presencia y ausencia de *P. cinnamomi* en plantones de encina y alcornoque. Se utilizarán hojas de cuatro poblaciones (3 resistentes y 1 susceptible) de encina y de alcornoque para la caracterización de la variabilidad en la respuesta a *P. cinnamomi* mediante aproximaciones ómicas (transcriptómica, proteómica y metabolómica). El tiempo de muestreo será definido por la fluorescencia emitida en hojas. Se usarán tres réplicas biológicas por especie, encina y alcornoque, y por tratamiento, control e infectado.

4.1. Transcriptómica: Se emplearán técnicas de transcriptómica de última generación, RNA-Seq, utilizando la plataforma Illumina. El análisis del transcriptoma se llevará a cabo aislando el ARN total y se llevando a cabo un análisis mediante RNA-Seq, mezclando el ARN de las tres réplicas para ajustar el coste. El ARN será cuantificado espectrofotométricamente y analizado mediante electroforesis en gel de agarosa, determinando su "RNA Integrity Number" (RIN) con 2100 Bioanalyzer (Agilent). Las muestras de ARN con RIN 8 o superior serán secuenciadas mediante la plataforma Illumina. Las lecturas se limpiarán y ensamblarán y se realizará la identificación de genes expresados diferencialmente.

4.2. Proteómica: Se utilizarán metodologías proteómicas complementarias, incluyendo aproximaciones holísticas de primera (basadas en electroforesis acoplada a espectrometría de masas) y tercera generación (las denominadas "gel-free" o de "shotgun"), asegurando con ello una cobertura más amplia del proteoma. En esta estrategia "shotgun", las proteínas extraídas serán cuantificadas, digeridas con tripsina, y los péptidos resultantes analizados por LC-MS (LC-MS-UHPLC-Orbitrap). La identificación de proteínas a partir de los datos m/z de los péptidos se llevará a cabo a partir de los datos de masas mediante búsqueda en bases de datos, utilizando el algoritmo MASCOT y SEQUEST. Se utilizarán bases de datos públicas (UniProt, Swiss-prot, NCBI), y específicas para *Quercus* sp. y *Q. ilex* construidas a partir de bases de datos de transcritos. La cuantificación de proteínas se llevará a cabo a partir del área del pico cromatográfico o de los iones parentales en el MS. Las proteínas diferenciales se determinarán tras el análisis estadístico uni- y multivariante.

4.3. Metabolómica: Para el análisis metabolómico de las muestras de hojas se llevará a cabo una extracción de metabolitos mediante el empleo de dobles solventes. Los extractos de metabolitos se llevarán a sequedad mediante el empleo de Speed Vac. Los residuos serán solubilizados en metanol. Se llevará a cabo un análisis por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (UHPLC-ESI-MS/MS (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 LC acoplado a Thermo Scientific Q Exactive MS)). La

identificación de compuestos se llevará a cabo utilizando el algoritmo Compound Discoverer 3.0, a partir de los valores de tiempo de retención, el valor m/z del ion precursor y de los correspondientes fragmentos. La búsqueda se hará en las bases de datos: mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>), ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>) y METLIN (https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage). La cuantificación se llevará a cabo a partir de las áreas de los picos cromatográficos y los picos MS del ion parental. Las diferencias entre muestras (individuos y/o tratamientos) se establecerán tras el análisis estadístico uni- y multivariante.

4. NORMATIVA DE APLICACIÓN

Normativa de Prevención de Riesgos laborales

Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos laborales, cuyo objetivo es promover la seguridad y salud de los trabajadores mediante la aplicación de medidas y el desarrollo de las actividades necesarias para la prevención de riesgos derivados del trabajo. Artículo 20: Medidas de emergencia.

R.D.39/1997, de 17 de enero por el que se aprueba el Reglamento de los servicios de prevención.

Ley 54/2003, de 12 de diciembre, de reforma de marco normativo de la prevención de riesgos laborales.

R.D.780/1998, por el que se modifica el R.D.39/1997.

R.D. 374/2001 de Protección frente a la exposición a agentes químicos.

R.D. 664/1997 de Protección frente a la exposición a agentes biológicos.

R.D. 486/1997 de Seguridad y salud en los lugares de trabajo.

R.D. 485/1997 de Señalización de seguridad y salud en el trabajo.

R.D. 1215/1997 y su modificación R.D. 2177/2004 de Seguridad y salud para la utilización por los trabajadores de los equipos de trabajo.

R.D. 773/1997 de Equipos de protección individual.)

R.D. 919/2006 de Reglamento de gases combustibles.

R.D. 2060/2008 de Reglamento de aparatos a presión.

R.D. 1495/19986 y su modificación R.D. 590/1989 de Reglamento de seguridad en máquinas.

R.D. 379/2001 de Reglamento de almacenamiento de productos químicos ()

R.D. 1942/1993 de Reglamentos de instalaciones de protección contra incendios.

R.D. 783/2001 de Reglamento de protección sanitaria contra radiaciones ionizantes.

R.D. 842/2002 de Reglamento electrotécnico de baja tensión.

5. COORDINACIÓN

El Director de los trabajos informará a TRAGSA de forma permanente y continua del desarrollo de los trabajos y de cualquier incidencia que pueda surgir para llevar a cabo las tareas objeto de este contrato.

6. CONDICIONES MEDIOAMBIENTALES

El adjudicatario declara conocer las obligaciones legislativas en materia medioambiental que pudieran resultar de aplicación de las actividades por él desarrolladas al amparo del presente contrato y se compromete a cumplir con todos los requisitos y exigencias legales que en materia de medio ambiente le sea de aplicación.

Asimismo, cuando Tragsa así lo requiera el adjudicatario acreditará la correcta gestión de los residuos peligrosos y no peligrosos que se generen durante la realización de los trabajos y el mantenimiento de sus equipos técnicos.

El adjudicatario, de acuerdo a la normativa que le afecte en cuanto a la actividad a realizar, declara su intención de reducir a lo estrictamente necesario el consumo de materias primas que comprometan la sostenibilidad de los ecosistemas naturales de los cuales se obtienen.

7. OBLIGACIONES EN MATERIA DE SEGURIDAD LABORAL

Los Contratistas estarán obligados a:

- Aplicar los principios de la acción preventiva que se recogen en el artículo 15 de la Ley de Prevención de Riesgos Laborales, dado que no existe una normativa específica para laboratorios en la legislación española..
- Informar y proporcionar las instrucciones adecuadas a los trabajadores sobre todas las medidas que hayan de adoptarse en lo que se refiere a su seguridad y salud en el laboratorio.
- Atender las indicaciones y cumplir las instrucciones del coordinador en materia de seguridad y de salud durante la ejecución del servicio.

Los Contratistas serán responsables de la ejecución correcta de las medidas preventivas fijadas en el Plan de Seguridad y Salud en lo relativo a las obligaciones que les correspondan a ellos directamente o, en su caso, a los trabajadores autónomos por ellos contratados, incluso será por cuenta del Contratista el coste de las protecciones individuales y colectivas necesarias para la correcta ejecución de la obra. Además, responderán solidariamente de las consecuencias que se deriven del incumplimiento de las medidas previstas en el Plan, en los términos del apartado 2 del artículo 42 de la Ley de Prevención de Riesgos Laborales, así como la obligatoriedad de la presencia en el centro de trabajo de los recursos preventivos, cualquiera que sea la modalidad de organización de dichos recursos. Se consideran recursos preventivos:

- a) Uno o varios trabajadores designados de la empresa.
- b) Uno o varios miembros del servicio de prevención propio de la empresa.
- c) Uno o varios miembros del o los servicios de prevención ajenos concertados por la empresa.

Dichos recursos preventivos deberán tener como mínimo la formación correspondiente a las funciones del nivel básico (50 horas), así como la capacidad, los medios necesarios y ser suficientes en número para vigilar el cumplimiento de las actividades preventivas, debiendo permanecer en el centro de trabajo.

Será causa inmediata de resolución del contrato el incumplimiento por parte del Contratista de sus obligaciones en materia de seguridad y salud laboral para con el personal de él dependiente, así como la falta de adecuación a la normativa vigente de seguridad, de la maquinaria y equipos que intervengan en la actuación objeto del contrato.

Madrid a 05 de diciembre de 2019

