

RESUMEN DE LA NOTIFICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE PLANTAS SUPERIORES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE (ANGIOSPERMAS Y GIMNOSPERMAS)

A. Información de carácter general

1. Detalles de la notificación

a) Numero de notificación: B/ES/25/19
b) Fecha de acuse de recibo de la notificación: 10 junio 2025
c) Título del proyecto: Ensayo de campo con variedades de cítricos para investigar modificaciones genéticas relativas a la acumulación de pigmentos antocianos y carotenoides en la fruta, así como otros aspectos relativos a su calidad y estabilidad.
d) Período propuesto para la liberación: verano 2025 a verano 2035

2. Notificador

(a) Nombre de la institución o empresa: GCM Citrus SL
--

3. *¿Tiene previsto el mismo notificador la liberación de esa misma PSMG en algún otro lugar dentro o fuera la Comunidad (de acuerdo con el apartado 1 del artículo 6)?*

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo, indique el código o códigos del país:	

4. *¿Ha notificado el mismo notificador la liberación de esa misma PSMG en algún otro lugar dentro o fuera de la Comunidad?*

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo, indique el número de notificación:	

B. Información sobre la planta modificada genéticamente

1. Identidad de la planta receptor o parental.

a) Familia: Rutaceae
b) Género: Citrus
c) Especie: <i>Citrus clementina</i> Hort ex. Tanaka, <i>Citrus reticulata</i> Blanco, <i>Citrus sinensis</i> L. Osb.
d) Subespecie (si procede):
Cultivar/línea de reproducción (si procede): Clemenules, Nadorcott, Valencia
e) Nombre vulgar: Mandarina y naranja dulce

2. Descripción de los rasgos y características que se han introducido o modificado, incluidos los genes marcadores y las modificaciones anteriores.

El conjunto de las líneas presenta modificaciones relativas a genes relacionados con la producción de pigmentos antocianos y carotenoides en cítricos, tanto por inserción de transgenes mediante intragenia o cisgenia, como mediante la modificación dirigida a secuencias con el uso de la tecnología de edición genómica CRISPR-Cas. Aunque muchos casos presentan integración del transgén de selección *nptII*, algunas líneas “cisgénicas” no lo contienen.

3. Tipo de modificación genética.

(a) Inserción de material genético: X (casos de cisgenia e intragenia)
(b) Eliminación de material genético: X (caso de edición genómica)
(c) Sustitución de una base:
(d) Fusión celular:
(e) Otro (especifíquese):

4. En caso de inserción de material genético, indique la fuente y la función prevista de cada fragmento componente de la región que se inserte.

Módulo de selección: NOSpro::nptII::NOSter: El gen *nptII* (neomicina fosfotransferasa) procede del transposón Tn5 de *E. coli*. Las regiones NOS, moduladoras de la expresión de *nptII*, proceden del gen de la nopalina sintasa (NOS) de *A. tumefaciens*. La expresión constitutiva del transgén confiere a las células resistencia a antibióticos aminoglicósidos como la kanamicina, la geneticina o la paromomicina.

Módulo intragenia: promotor específico fruto::gen interés::NOSter: La región promotora procede de un gen de *C. sinensis*, que confiere expresión específica en fruta en las células transformadas, y la región terminadora procede del gen *NOS* de *A. tumefaciens*. La secuencia del gen de interés procede del gen denominado GOII de una variedad de *C. sinensis* y, bajo el control del promotor específico de fruta, confiere la propiedad de producir y acumular antocianos en la fruta de las variedades que lo expresen. En la secuencia codificante del transgén se han eliminado los intrones propios de la secuencia genómica. En algunos casos, se ha omitido el gen de interés, para obtener líneas transgénicas sólo con el fragmento del

promotor específico de fruto.

Módulo cisgenia: El módulo completo (promotor+CDS+terminador) procede del gen de interés GOI1 de una variedad de *C. sinensis*. No se han realizado cortes ni adiciones de secuencia en el módulo, por lo que se considera un módulo cisgénico. Es decir, esta secuencia sí contiene los intrones de la secuencia genómica, que fueron eliminados en el caso de la intragenia.

Módulo edición CRISPR/Cas9: La región hCas9 procede de la unión del promotor 35S a la secuencia del gen de la endonucleasa Cas9/Csn1 (CRISPR subtype II/NMENI RNA-guided, TIGR01865) y el elemento PAM-I (PAM-interacting domain of CRISPR-associated endonuclease Cas9; pfam16595). La región promotora procede del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y confiere expresión prácticamente constitutiva del transgén en las células transformadas. La región sgRNA procede de la unión de un promotor U6 de tipo RNA polimerasa III (polIII) a la secuencia específica diseñada para la edición de una zona del gen endógeno de interés de cítricos GOI2 y un terminador mínimo. Esta secuencia completa queda integrada en el genoma de la planta transgénica editada.

5. En caso de eliminación u otra modificación del material genético, indique la función de las secuencias eliminadas o modificadas.

En el caso de líneas editadas, la eliminación de secuencias se hace sobre la región codificante (o promotora) del gen de interés GOI2, lo que provoca el bloqueo de la ruta metabólica correspondiente. El gen está implicado en la ruta de carotenogénesis.

6. Descripción resumida de los métodos utilizados en la modificación genética.

La modificación genética fue introducida mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Explantes de entrenudo de plantas adultas de las variedades comerciales antes mencionadas se inocularon y cocultivaron con la bacteria, en concreto la cepa desarmada EHA105 de *A. tumefaciens*, portadora de un plásmido vector con un T-DNA que incluía el gen *nptII* y el/los gen/es de interés bajo un promotor de expresión específica en fruta de cítricos. Tras un periodo de selección en medio nutritivo suplementado con el antibiótico kanamicina, los brotes regenerados en los experimentos de transformación se injertaron in vitro sobre plántulas de semillas del patrón citrange Carrizo y se analizaron para confirmar su naturaleza transgénica. En caso de ser positivas, las plántulas se reinjertaron en el invernadero sobre un patrón vigoroso citrange Carrizo o *Citrus macrophylla* cultivado en maceta para acelerar su desarrollo.

7. Si la planta receptor o parental pertenece a una especie de árboles forestales, describa las vías y la extensión de la diseminación, así como los factores que afectan a esta.

No procede

C. Información sobre la liberación experimental

1. *Finalidad de la liberación (incluida toda información pertinente disponible en esta fase) como, por ejemplo: fines agronómicos, ensayo de hibridación, capacidad de supervivencia o diseminación modificada, ensayo de los efectos en los organismos diana y en los que no lo son.*

El objetivo de la presente liberación es estudiar el comportamiento agronómico de variedades comerciales de mandarino y naranjo modificadas genéticamente en cuanto a la producción de pigmentos antocianos y carotenoides, ya que expresan ectópicamente el gen de interés bajo su propio promotor (caso cisgenia) o bajo el control de un promotor de cítricos específico de fruta (caso intragenia) o bien en las que se ha modificado por edición genética el gen de interés. Los aspectos concretos del estudio se centrarán en la estabilidad de la producción de fruta, la evaluación de la calidad de la fruta y en las posibles diferencias en las características de fructificación frente a los controles no modificados:

- La estabilidad de los caracteres modificados.
- La modificación del color de los frutos y consiguiente acumulación de carotenoides o antocianos en campañas sucesivas.
- Las características morfológicas y fenológicas y los parámetros que determinan la calidad del fruto en los árboles transgénicos y control.

No consideramos objetivo de la liberación el estudio de la transferencia de transgenes entre especies o variedades de cítricos o la transferencia de transgenes hacia otros organismos diferentes a los incluidos en la liberación. Tampoco pretendemos estudiar el efecto nutricional de las modificaciones previstas en cuanto a la composición de pigmentos antocianos o carotenoides sobre la salud de las personas o los animales, por lo que no se incluyen análisis de este tipo en la propuesta actual.

2. *Localización geográfica del lugar de la liberación.*

La parcela se halla ubicada en la provincia de Valencia, término municipal de Chiva.

3. *Área del lugar (m²).*

La zona acotada para el ensayo tiene una superficie de 0,25 hectáreas. Tiene un único acceso a través de una malla principal más grande, de 0,5 hectáreas.

4. *Datos pertinentes sobre liberaciones anteriores de esa misma PSMG, si los hubiera, específicamente relacionados con las repercusiones potenciales de su liberación en el medio ambiente y la salud.*

No se han realizado liberaciones anteriores de estas mismas PSMG. Sin embargo, sí se han realizado liberaciones de cítricos modificados genéticamente en España y en la Comunidad Valenciana; en concreto, se pueden mencionar las notificaciones B/ES/08/03, B/ES/08/04, B/ES/08/05, B/ES/08/21 y B/ES/08/02, realizadas por parte del IVIA en una parcela experimental ubicada en Castellón. En ningún caso se notificaron repercusiones reseñables sobre el medioambiente o en la salud de las personas.

D. Resumen del impacto ambiental potencial de la liberación de la PSMG de conformidad con el apartado D.2 del anexo II de la Directiva 2001/18/EC

Indique, en especial, si los rasgos introducidos podrían conferir directa o indirectamente una ventaja selectiva mayor en medios ambientes naturales; explique también todo beneficio ambiental significativo esperado.

Los rasgos introducidos no confieren directa o indirectamente una ventaja selectiva mayor a las líneas MG en medios naturales, ya que la producción de compuestos carotenoides o antocianos específicamente en fruta no se hallan relacionados con características de resistencia o tolerancia a posibles estreses bióticos o abióticos de la planta.

E. Descripción resumida de todas las medidas tomadas por el notificador para controlar el riesgo, incluido el aislamiento para limitar la dispersión, como, por ejemplo, propuesta de seguimiento incluido el seguimiento después de la cosecha.

Las PSMG se hallan confinadas en el interior de la malla antitrip y esto dificulta e impide prácticamente la diseminación de polen, semillas y otro material vegetal. La parcela se encuentra vallada en su perímetro exterior. Además, la distancia desde la malla de liberación hasta los árboles cultivados en la finca comercial es de más de 10 metros (la variedad más cercana es la variedad estéril Washington Navel, que no produce semillas; la variedad compatible más cercana sería Nadorcott y se encuentra a más de 50 metros de distancia de la malla). Los genotipos híbridos de la malla contigua A, sin contacto con la malla B, no se destinan a comercialización, tampoco la fruta producida. La parcela no se destinará a uso comercial en 2 años tras la finalización de los ensayos. Los árboles de la parcela, una vez acabados los ensayos, se arrancarán de raíz y se procederá a su quema controlada. Se hará un seguimiento de posibles germinaciones de cítricos indeseadas, que se arrancarán, y se tratará el terreno con herbicidas y sucesivos pases de arado con un subsolador topo.

F. Resumen de los ensayos de campo previstos para obtener nuevos datos sobre las repercusiones de la liberación en el medio ambiente y la salud humana (si procede)

No procede